

OXYTOCINREZEPTOREN UND SEXUALHORMON BINDENDES GLOBULIN IM SCHIZOPHRENEN UND GESUNDEN MENSCHLICHEN HYPOTHALAMUS

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades:
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sabrina Anderson de la Llana
geboren am 12. 01.1980 in St. Martin d'Hères

Gutachter:

1. Prof. G. Jirikowski
2. Prof. H. Sauer
3. Prof. E. G. Bernstein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05/04/2005 / Examen: 10/05/05

Inhaltsverzeichnis:

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Hypothalamus und hypothalamo-hypophysäres System	3
2.1.1.	Lokalisation im Gehirn	3
2.1.2.	Die Struktur des Hypothalamus	3
2.1.3.	Hypothalamo-hypophysärer Trakt	4
2.1.4.	Neuroendokrine Zellen	5
2.1.5.	Anatomische und funktionelle Integration im limbischen System	5
2.2.	Das oxytocinerge System	6
2.2.1.	Oxytocin	6
2.2.1.1.	Struktur	6
2.2.1.2.	Genstruktur	6
2.2.1.3.	Genregulation	7
2.2.2.	Der Oxytocinrezeptor (OTR)	7
2.2.2.1.	Struktur des Rezeptors	7
2.2.2.2.	Genstruktur	8
2.2.2.3.	Genregulation und Steroide	8
2.2.3.	Das oxytocinerge System in der Peripherie	9
2.2.4.	Das oxytocinerge System im ZNS	9
2.2.4.1.	OT Lokalisation im ZNS	9
2.2.4.2.	OTR Lokalisation im ZNS	10
2.2.5.	Zentrale Einflüsse des oxytocinergen Systems auf das Verhalten	11
2.2.5.1.	ZNS-Störungen und Oxytocin	11
2.3.	SHBG	13
2.3.1.	Struktur	13
2.3.2.	Genstruktur	13
2.3.3.	SHBG im ZNS	14
2.3.4.	SHBG und Steroide	15
2.4.	Schizophrenie	16
2.4.1.	Klinik	16
2.4.1.1.	Psychische Veränderungen	16
2.4.1.2.	Positiv- und Negativsymptomatik	17
2.4.1.3.	Diagnose	17

2.4.2.	Ätiopathogenese	18
2.4.2.1.	Dopamin und das Weinberger Modell	18
2.4.2.2.	Schizophrenie und OT	18

3.	Zielsetzung	20
----	-------------	----

4.	Material und Methoden	21
----	-----------------------	----

4.1.	Untersuchtes Material	21
------	-----------------------	----

4.2.	Eponeinbettung	22
------	----------------	----

4.3.	Immunhistochemische Färbung von Eponschnitten	23
------	---	----

4.4.	Affinitätschromatographie	25
------	---------------------------	----

4.5.	SDS Elektrophorese und Western Blot	26
------	-------------------------------------	----

4.5.1.	Prinzipien und Ziele	26
--------	----------------------	----

4.5.2.	Protokoll	26
--------	-----------	----

4.6.	Auswertung	29
------	------------	----

4.6.1.	Kriterien zur Auswahl der Schnitte	29
--------	------------------------------------	----

4.6.2.	Auszählung der Präparate	29
--------	--------------------------	----

4.6.3.	Vergleich zwischen Hypothalami gesunder und schizophrener Patienten	29
--------	---	----

4.6.4.	Auswertung der Zellkolokalisation verschiedener Neuropeptide	30
--------	--	----

4.7.	Materialien	31
------	-------------	----

4.7.1.	Materialien für die Eponeinbettung	31
--------	------------------------------------	----

4.7.2.	Materialien der Immunhistochemie	31
--------	----------------------------------	----

4.7.2.1.	Enttharzungslösung	31
----------	--------------------	----

4.7.2.2.	Antikörper	32
----------	------------	----

4.7.2.3.	Pufferverzeichnis und Chemikalien der ICH	33
----------	---	----

4.7.3.	Materialien der Säulenaaffinitätschromatographie	33
--------	--	----

4.7.3.1.	Apparatur	33
----------	-----------	----

4.7.3.2.	Reagentien	33
----------	------------	----

4.7.3.3.	Gel- und Pufferherstellung	33
----------	----------------------------	----

5.	Ergebnisse	35
----	------------	----

5.1.	Nachweis von OTR und SHBG im Hypothalamus des Menschen	35
------	--	----

5.2.	Western Blot	39
------	--------------	----

5.3.	Kolokalisation von NP, OTR und SHBG	40
5.4.	Vergleich von OT- und OTR- Immunreaktivität bei Schizophrenen und Kontrollen	46
6.	Diskussion	49
6.1.	Histochemische Untersuchungen an menschlichem post mortem Gewebe	49
6.2.	Oxytocin im gesunden und im schizophrenen menschlichen Hypothalamus	50
6.3.	SHBG im menschlichen Hypothalamus	51
6.4.	OTR im menschlichen Hypothalamus	53
6.5.	Kolokalisation von OT, SHBG und OTR bei Schizophrenen und Gesunden	56
7.	Schlussfolgerungen	59
8.	Literaturverzeichnis	60
Anhang		75
Lebenslauf		75
Danksagung		77
Ehrenwörtliche Erklärung		78

Abkürzungsverzeichnis:

Abb:	Abbildung
ABP:	Androgen bindendes Protein
ADH:	Adiuretisches Hormon
ADP:	Adenosin Diphosphat
Asn:	Asparagin
bzw.:	beziehungsweise
°C:	Grad Celcius
cAMP:	zyklisches Adenosin Monophosphat
cps:	Centipoise
CRH:	Corticotropin-releasing-Hormon
Cys:	Cystein
DHT:	Dihydrotestosteron
DSM:	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
ERE:	Estrogene Response Element
FSH:	Follicle-stimulating-Hormon
g:	Gramm
GHRH:	Growth-hormone-releasing-Hormon
Gln:	Glutamin
Gly:	Glycin
h:	Stunde
ICD:	International Classification of Diseases
IgA:	Immunglobulin A
IgG:	Immunglobulin G
IHC:	Immunhistochemie
Ile:	Isoleucin
H ₂ O:	Wasser
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HCl:	Salzsäure
HHL:	Hypophysenhinterlappen
HVL:	Hypophysenvorderlappen
Kb:	Kilobasenpaare
kDa:	Kilodalton
Leu:	Leucin
LHRH:	Luteinising-hormone-releasing-Hormon
Lys:	Lysin
mA:	Milliampere
min:	Minute
MG:	Molargewicht
mg:	Milligramm
mL:	Milliliter
mm:	Millimeter
mV:	Millivolt
µL:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
mRNA:	Messenger Ribonukleinsäure
N:	Nervus

NaOH:	Natriumlauge
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NO:	Stickstoff Monoxid
NP:	Neurophysin
NP I:	Neurophysin I
NPV:	Nukleus paraventricularis
NSO:	Nukleus supraopticus
OT:	Oxytocin
OTR:	Oxytocinrezeptor(en)
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PKA:	Proteinkinase A
PKC:	Proteinkinase C
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Pro:	Prolin
SHBG:	Steroidhormon-Bindungsglobulin
s.o.:	siehe oben
TRH:	Thyrotropin-releasing-Hormon
Tyr:	Tyrosin
UDP:	Uracil Diphosphat
V:	Volt
v.a.:	vor allem
VP:	Vasopressin
z.B.:	zum Beispiel
ZNS:	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Der Hypothalamus, Regulationszentrum vegetativer Funktionen und Koordinationszentrum für Verhaltensweisen, bildet im Nukleus supraopticus und Nukleus paraventricularis unter anderem auch Oxytocin. Bei den Tiermodellen übernimmt das oxytocinerge System eine wichtige Rolle bei der Regulation von Verhaltensweisen, die durch Sexualsteroiden moduliert werden. Störungen im Oxytocin System hängen mit zentralnervösen Krankheiten zusammen, möglicherweise auch mit Schizophrenie.

Die Regulationsmechanismen des Oxytocins sind sehr komplex und hängen sowohl von der geregelten Oxytocin Genexpression als auch der Expression von Oxytocinrezeptoren am Zielorgan ab. Diesbezügliche histochemische Untersuchungen existieren vom Mensch noch nicht und waren zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit. Das Oxytocinrezeptor Gen wird beim Tier je nach Hirnareal mit komplexen regionsspezifischen Mechanismen induziert, unter denen die Steroidhormone einen großen Stellenwert einnehmen. Bisher wurden Oxytocinrezeptoren sowie die entsprechende Genexpression bei verschiedenen Tieren und in vielen der Zentralnervensystem Areale nachgewiesen, die mit dem Verhalten eng verknüpft sind.

Steroidhormon-Bindungsglobulin wirkt in der Peripherie als Transportglobulin für Sexualsteroiden und erhöht die Affinität zu Steroiden in Organen durch gesteigerte Steroidhormon-Bindungsglobulin Genexpression und Synthese. Versuche haben beim Tier Steroidhormon-Bindungsglobulin im Hypothalamus nachgewiesen und dessen Einfluss auf das Sexualverhalten erforscht. SHBG im humanen Gehirn ist bisher noch nicht nachgewiesen worden. Die Verfügbarkeit der Steroidhormone im Hypothalamus und deren Einfluss auf das oxytocinerge System könnte mit der Existenz eines Sexualhormon bindenden Globulins im menschlichen Hypothalamus verknüpft sein.

Ziel dieser Arbeit war es, Oxytocinrezeptor und Steroidhormon-Bindungsglobulin in magnozellulären Neuronen des Nukleus supraopticus und des Nukleus paraventricularis nachzuweisen. Die Kolo-kalisation der Oxytocin bildenden Zellen mit Oxytocinrezeptor und Steroidhormon-Bindungsglobulin wurde mit immunhistochemischen Doppelfärbungen untersucht.

Des Weiteren wurde ein morphologischer Vergleich der Oxytocin und Oxytocinrezeptor enthaltenden Zellen im Nukleus supraopticus und des Nukleus paraventricularis schizophrener Patienten mit Gesunden durchgeführt, um den Einfluss des Oxytocins und seiner Regulationsmechanismen bei der Entstehung der Krankheit etwas näher zu kommen.

Die in Eponharz eingebetteten konsekutiven Semidünnschnitten der Nuklei paraventriculares und Nuklei supraoptici von 5 schizophrenen Patienten und 7 Kontrollen wurden mit Steroidhormon-Bindungsglobulin, Oxytocinrezeptor und Oxytocin Antikörper immunhistochemisch markiert. Es wurde dann die Lokalisation und Kolokalisation der 3 Antigene in den beiden Nuklei mikroskopisch ausgewertet, sowie ein statistischer Vergleich der Unterschiede an Oxytocinrezeptor und Oxytocin zwischen Schizophrenen und Gesunden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Western Blot Analysen von Hypothalamushomogenaten weiterhin bestätigt.

Diese Arbeit weist zum ersten mal Steroidhormon-Bindungsglobulin und Oxytocinrezeptor auf zellulärem Niveau im menschlichen Hypothalamus nach und bestätigt frühere biochemische Befunde. In situ Hybridisierungen von mRNA bei der Ratte zeigen eine Lokalisation von Steroidhormon-Bindungsglobulin in Hypothalamus-Neuronen, und es ist nahe liegend, dass menschliche Neurone Steroidhormon-Bindungsglobulin in ähnlicher Weise produzieren. Steroidhormon-Bindungsglobulin wird wahrscheinlich nicht aus dem Blut aufgenommen, da es aufgrund seiner Molekülgröße die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann.

Die Lokalisation von Steroidhormon-Bindungsglobulin im Hypothalamus, Infundibulum und Eminentia mediana legt nahe, dass dieses vielfältige Funktionen in diesen Regionen haben könnte: Fasern vom Hypothalamus projizieren in das Rückenmark und den Hirnstamm, das Striatum, den hypothalamo-hypophysiären Trakt und in das periventrikuläre System, in engem Kontakt zum Liquor. Es ist bekannt, dass Steroidhormon-Bindungsglobulin im Liquor vorhanden ist. Diese Lokalisationen sind weitgehend übereinstimmend mit der Verteilung des oxytocinergen Systems. Diese multiplen Lokalisationen legen nahe, dass es im Hypothalamus ein intrinsisches Steroid Bindungssystem gibt mit der Funktion eines Hypophysenhinterlappenhormons, zentralen Transmitters und hypophyseotropen Faktors.

Die Kolokalisation mit Oxytocin legt eine funktionelle Beziehung zu diesem Peptid nahe. Ähnlich wie es beim Versuchstier gezeigt wurde, könnte Steroidhormon-Bindungsglobulin beim Menschen Sexualverhalten, mütterliche Instinkte und Sozialverhalten, aber auch die zentrale Stressantwort steuern, weswegen sich dadurch möglicherweise neue Gesichtspunkte für die Entstehung von affektiven Erkrankungen ergeben.

Die Verminderung von Oxytocinrezeptor beim schizophrenen Patient ist ein neuer Befund und könnte mit der bekannten Vermehrung der Expression von Oxytocin korrelieren. Therapeutische Ansätze mit Oxytocin für die Schizophrenie werden diskutiert.

2. Einleitung

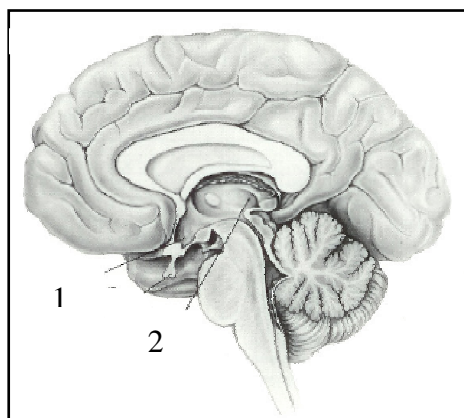
2.1. Hypothalamus und hypothalamo-hypophysäres System

Der Hypothalamus ist das oberste Integrationsorgan vegetativer Funktionen. Die meisten seiner Kerne sind efferent mit vegetativen Zentren im Hirnstamm und Rückenmark oder mit der Aufgabe der hormonellen Regulation mit der Eminentia mediana und dem Hypophysenhinterlappen verbunden. Im Gehirn bilden sich multiple Schaltkreise untereinander aus und so erhält der Hypothalamus Afferenzen aus dem ganzen ZNS, ebenfalls aus dem Großhirnkortex und dem limbischen System, was die Beeinflussung vegetativer Parameter durch psychische Vorgänge verständlich macht.

Der Hypothalamus ist u.a. für die Koordination von Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme, Körpertemperatur, Stresskontrolle, Wachstum und Reproduktionsverhalten verantwortlich (Trepel, 1999).

2.1.1. Lokalisation im Gehirn

Der Hypothalamus bildet den Boden des dritten Ventrikels und einen Teil seiner Seiten- und Vorderwand. Sichtbare Grenzen bilden von posterior nach anterior: die Corpora mamillaria, das Tuber cinereum, das



Infundibulum mit der Neurohypophyse und am Übergang des Tuber cinereum in das Infundibulum die Eminentia mediana. Nach vorne befinden sich das Chiasma opticum, die Lamina terminalis und die Commissura anterior (Trepel, 1999).

Abb 1: Lokalisation des Hypothalamus im Gehirn:

1. Hypothalamus, 2. Thalamus (aus Kupfermann, 1991)

2.1.2. Die Struktur des Hypothalamus

Der Hypothalamus wird in eine laterale und mediale Region eingeteilt. Die caudale Region enthält Faserverbindungen zum Telencephalon und die Corpora mamillaria. Medial befinden sich die hypothalamischen Nuklei (siehe Abb. 2). Der Nukleus paraventricularis grenzt lateral an die Wand des dritten Ventrikels, der Nukleus supraopticus befindet sich basal des Hypothalamus oberhalb des Chiasmas und des Tractus opticus (Kupfermann, 1991).

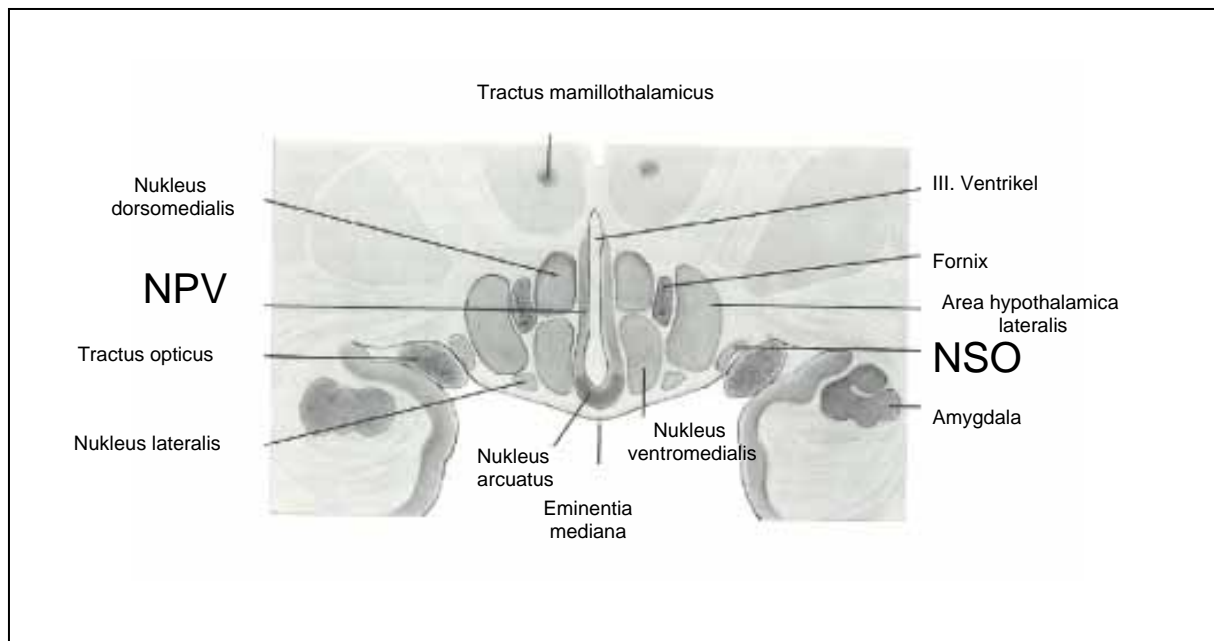
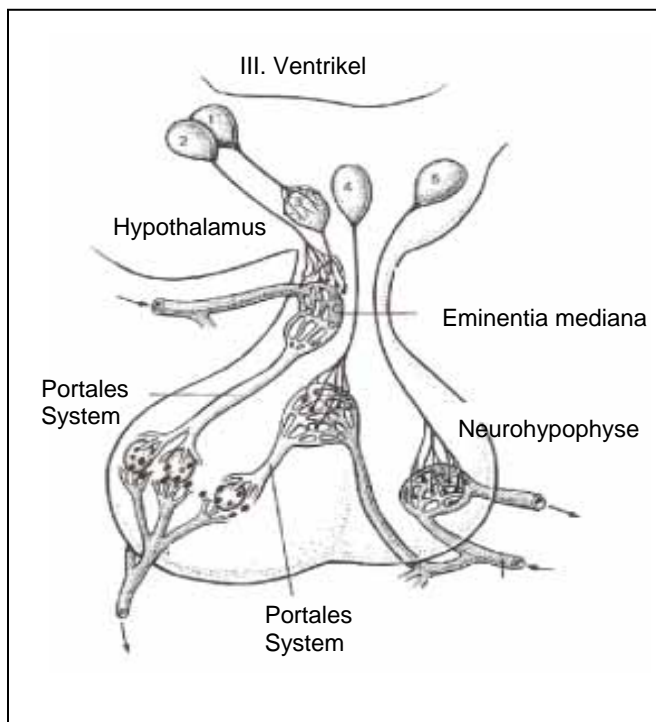


Abb. 2: Lokalisation vom NPV und NSO im Hypothalamus (aus Kupfermann, 1991)

2.1.3. Hypothalamo-hypophysärer Trakt

Nach einem Transport von Sekretprodukten, hauptsächlich Peptidhormonen, in den Axonen der hypothalamischen neurosekretorischen Zellen, enden diese im Hypophysenhinterlappen oder in der Eminentia mediana in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße. Die Peptidhormone werden in Nervenendigungen gespeichert und stimulusabhängig ausgeschüttet.



Die Sekrete des Hypothalamus beeinflussen direkt durch die Eminentia mediana die Adenohypophyse, indem Releasing Faktoren in das hypophysäre Pfortadersystem gelangen und so die Sekretion der entsprechenden Hormone beeinflussen. Hormone magnozeller Neurone werden durch deren Axone in dem Hypophysenhinterlappen sezerniert (ADH und OT). Dieser Vorgang wird als Neurosekretion bezeichnet. Die Neuronenbündel vom Hypothalamus in den HHL bilden den hypothalamo-hypophysären Trakt (Abb.3).

Abb. 3: Hypothalamo-hypophysärer Trakt (aus Kupfermann, 1991)

2.1.4. Neuroendokrine Zellen

Hypothalamische Neurone sind neurosekretorische Zellen, die nicht nur elektrische Impulse weiterleiten, sondern auch zusätzlich eine endokrine Funktion erfüllen. Die Releasing Hormone (CRH: Corticotropin-releasing-Hormon, TRH: Thyrotropin-releasing-Hormon, LHRH: Luteinising-hormone-releasing-Hormon, Somatostatin, GHRH: Growth-hormone-releasing-Hormon) werden in parvo-zellulären Neuronen gebildet, die in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus lokalisiert sind.

Magnozellular Zellen sind für die Sekretion von OT und VP in den HHL verantwortlich, diese Zellen sind vor allem im Nukleus supraopticus und paraventricularis vorhanden. Die elektrische Aktivität der Neurone bewirkt die Sekretion der Hormone (Kupfermann, 1991).

2.1.5. Anatomische und funktionelle Integration im limbischen System

Der Hypothalamus ist mit dem Papez-Neuronenkreis verbunden (siehe Abb. 4). Es bestehen Verbindungen mit dem präfrontalen Kortex und in dem limbischen System (bestehend aus dem Gyrus cingulati, dem Gyrus parahippocampalis, der Amygdala und dem Hippocampus). Diese Strukturen sind wichtig für die Entstehung von Emotionen, Lernen, Verhalten und Befinden (Kupfermann, 1991).

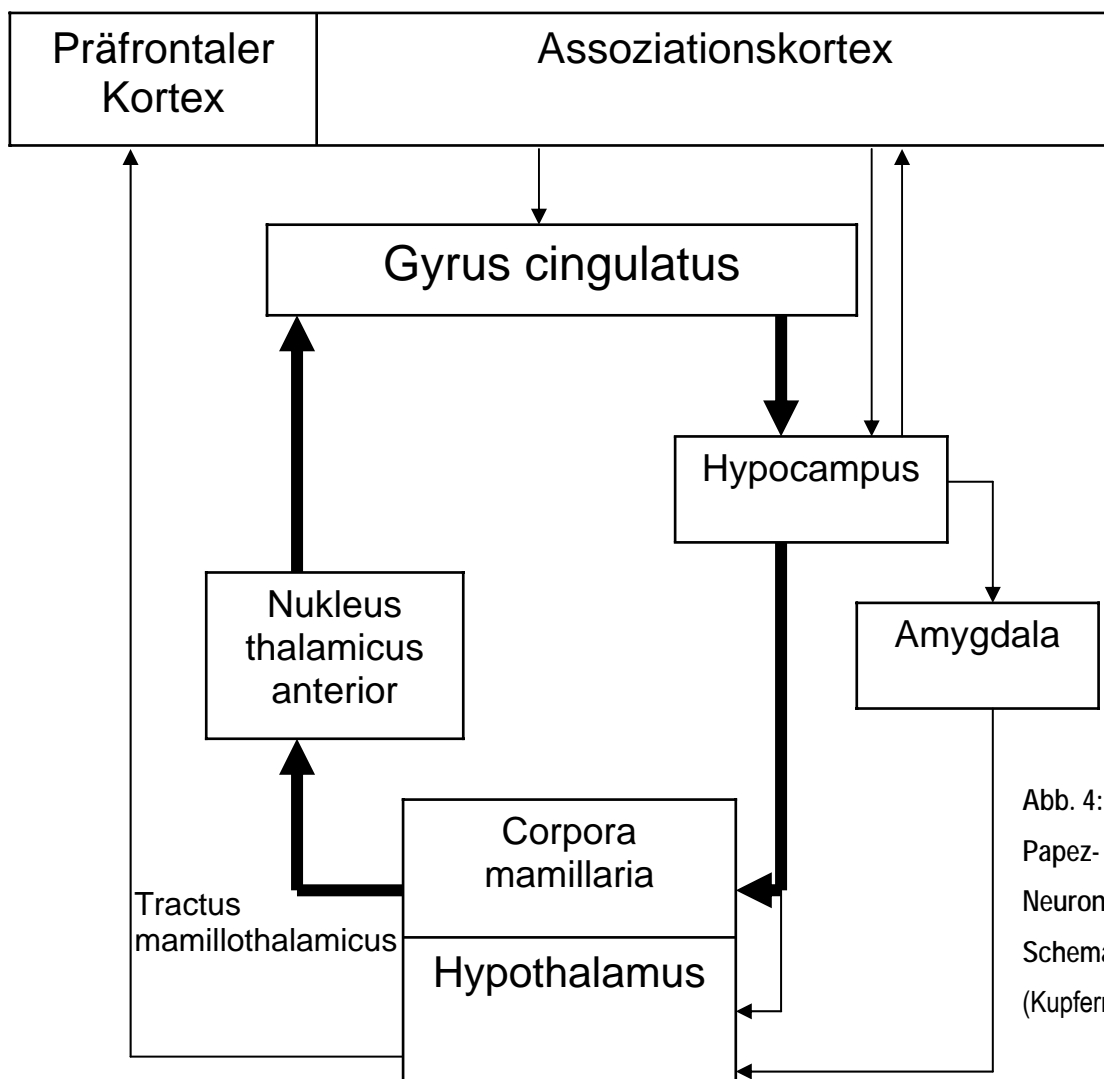


Abb. 4:
Papez-
Neuronenkreis
Schematisierung
(Kupfermann, 1991)

2.2. Das oxytocinerge System

2.2.1. Oxytocin

2.2.1.1. Struktur

Das neurohypophysäre Hormon Oxytocin ist das erste Peptidhormon, dessen Funktion und chemische Struktur (durch Dale, 1906 und Vigneaud et al., 1953) als Nonapeptid mit der Aminosäuresequenz: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ beschrieben worden ist. Das Hormon wurde nach seiner uterotischen Wirkung, und infolgedessen seiner Eigenschaft eine schnelle Geburt einzuleiten, benannt ($\omega\kappa\upsilon\zeta$ = schnell, $\tau\omicron\kappa\omicron\zeta$ = Geburt). OT ist auch für die Milchejektion wichtig. 1984 wurde die Struktur des Gens erstmalig sequenziert (Ivell und Richter, 1984).

2.2.1.2. Genstruktur

In allen Spezies befinden sich OT und Vasopressin Gene auf dem selben Genlocus, werden jedoch in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Die intergenische Distanz zwischen beiden Genen beträgt 3-12kb bei der Maus, Ratte, und dem Mensch (Sausville et al., 1985, Mohr et al., 1988 und Harya et al., 1990). OT ist Neurophysin I assoziiert. Das humane Gen für OT-Neurophysin ist auf dem Chromosom 20p13 lokalisiert (Rao et al., 1992). Die Genstruktur besteht aus drei Exons und zwei Introns (Abb. 5.). Kodierungsstellen für Neurophysin sind auf dem Gen vorhanden. Es ist Teil des Prohormons von OT und ist für den Transport von OT entlang des Axons magnozellularer Neurone des Hypothalamo-hypophysären Traktes und Speicherung der Granula innerhalb des terminalen Axons mit verantwortlich (Renaud et al., 1991).

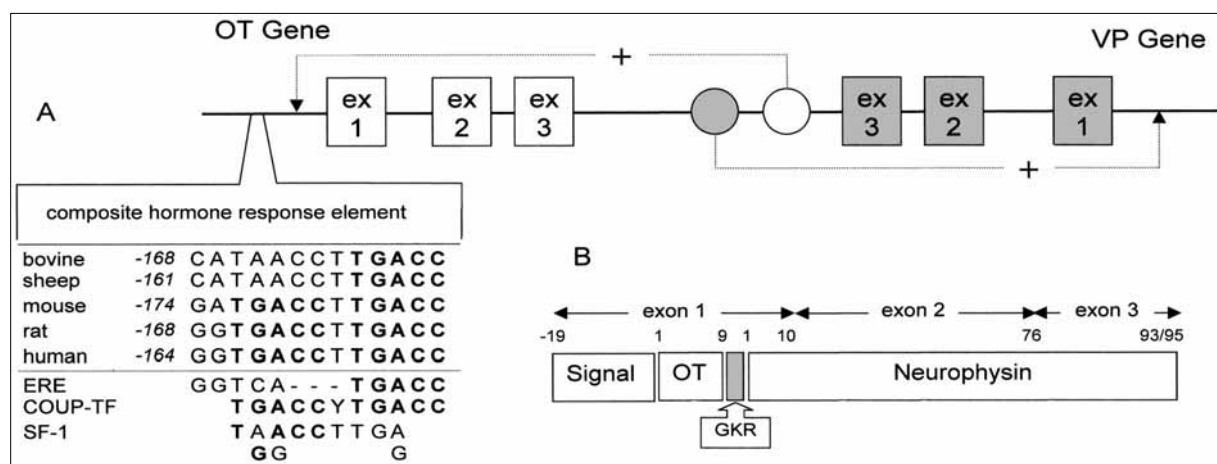


Abb. 5: Das OT Gen: A: Der Genlocus für OT und VP besteht aus jeweils 3 kodierende Exons und Enhancer Stellen in der Interkodierenden Region, B: das Präprohormon von OT vor der enzymatischen Spaltung an der Glycyl-lysyl-arginine (GKR) Sequenz.

2.2.1.3. Genregulation

Auf diesem Gen, zwischen Exon 3 von OT und Exon 3 von Vasopressin befinden sich spezifische Enhancer für OT oder VP. Weitere zellspezifische Enhancer (z.B. für die spezifische Transkription von OT im Hypothalamo-neurohypophysiärer Trakt) gibt es in den nonkodierenden Abschnitten des jeweiligen anderen Hormons (Ho et al., 1995; Gainer, 1998).

Ein nukleärer Hormon Rezeptor Locus vor dem Exon I enthält eine ERE („estrogen response element“) ähnliche Struktur bei der Ratte und beim Menschen, welche sich durch Estradiol stimulieren lässt (Burbach et al., 1994). Jedoch befinden sich in oxytocinergen magnocellulären Neuronen des Hypothalamus keine nukleären Estrogen Rezeptoren, die zusammen mit den Östrogenen, in vitro co-transfiziert, die OT Transkription anregen (Peterssen et al., 1999). Allerdings sind in magnozellulären Neuronen des NSO und NPV Thyroid Rezeptoren beschrieben worden, auch wenn Thyroid Hormone wenig Einfluss auf die OT Expression haben (Adan et al., 1992).

Weitere Regulation wird durch Transkriptionsfaktoren wie COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor), (Burbach et al., 1994), ARP-1 (apolipoprotein A1 regulatory Protein, SF-1 (steroidogenic factor) und Brn-2 Proteine im NSO und NPV ermöglicht. Zusammengefasst scheint die Genregulation in vivo einem komplexen Zusammenhang mehrerer Enhancer und Supressoren zu unterliegen.

2.2.2. Der Oxytocinrezeptor (OTR)

2.2.2.1. Struktur des Rezeptors

Das Gen des humanen OTR wurde von Kimura et al. 1992 zum ersten Mal sequenziert. Sein Produkt ergibt ein 389 Aminosäuren langes Polypeptid mit 7 Transmembran-Domänen (Abb. 6), welches zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört und durch eine Inositol Triphosphat-

Proteinkinase C (IP₃-PKC) Kaskade aktiviert wird. 3 N-Glycosilierungen an der 1. extrazellulären Domäne erhöhen die Affinität des OTs zum OTR.

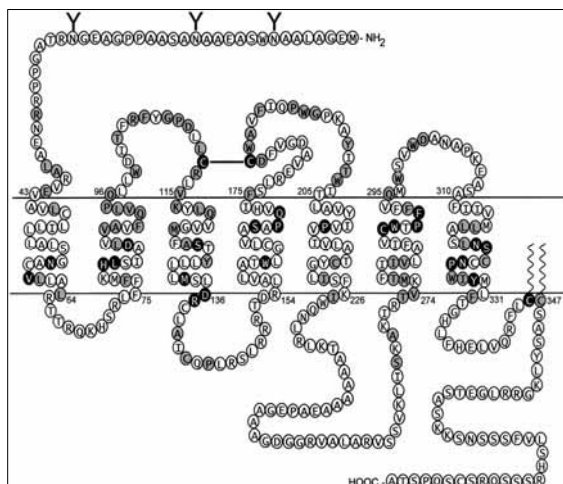


Abb. 6: Der OT Rezeptor

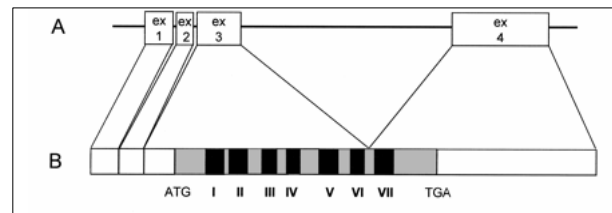
Schematische Struktur des OT Rezeptors, ein G-Protein mit 7 transmembran-Domänen und 3 N-Glycosylierungen.

2.2.2.2. Genstruktur

Der Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 3p25-3p26.2 (Inoue et al., 1994; Simmons et al., 1995). Das Gen enthält drei Introns und 4 Exons (siehe Abb. 7) und besitzt mehrere Promotorsequenzen für Transkriptionsfaktoren wie Interleukin 6 (NF-IL6) und Akut Phase Proteine (acute phase reactant responsive elements, APRE (Rozen, 1995), cAMP response elements (CRE) und eine ERE ähnliche Stelle (Bale und Dorsa, 1997), die aber wenig auf Estradiol anspricht.

Abb. 7: Das OTR Gen

Das OTR Gen (A) enthält 4 Exone. Der tatsächliche Rezeptor wird von Exon 3 und 4 kodiert (B).



2.2.2.3. Genregulation und Steroide

Trotz keiner klassischen EREs wird im Uterus und Hypothalamus die OTR Regulation durch Schwankungen der Steroidspiegel, vor allem Estradiol, beeinflusst. Die Bindung von OT im Rattengehirn steigt durch Gabe von Estradiol oder Testosteron, vor allem in Gehirnarealen, die mit der Geschlechtsfunktion in Verbindung gebracht werden (Tribollet et al., 1990). Auch die Expression von OTR, sowie die zelluläre Konzentration an OTR-mRNA hängt von der Sexualhormonkonzentration ab. Studien mit in situ Hybridisation für OTR mRNA und [125I]-Ornithin-Vasotocin als OTR-Agonist zeigen, dass bei Ratten mit erhöhtem Estrogen- bzw. Progesteronspiegel die OTR und OTR-mRNA Konzentration in der Amygdala und im ventromedialen Hypothalamus (VMH) steigt. (Bale und Dorsa, 1995). Hormonabhängige geschlechtsspezifische Unterschiede sind demzufolge zu erwarten (Bale et al., 1995a). Da dieser Einfluss von Sexualsteroidhormonen nicht immer positiv mit der Genexpression von OTR korreliert, könnte ihre indirekte Wirkung mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang stehen (Ivell und Walther, 1999).

In vitro wird die OTR-Expression durch PKA oder PKC induziert (Bale und Dorsa, 1998). Diese Induktion ist Gehirnareal-spezifisch. Im ventromedialen Hypothalamus von Ratten wird sie durch östrogenabhängige PKC Induktion hervorgerufen, während in der Amygdala Dopamin durch PKA die OTR-Expression induziert wird (Bale et al., 2001). Diese regionspezifische Induktion der Transkription geht mit einer unterschiedlichen Funktion des oxytocinergen Systems einher (Vasevudan et al., 2001).

2.2.3. Das oxytocinerge System in der Peripherie

Das schwangere Uterus ist Zielorgan des uterotonischen Hormons. Durch erhöhtes Östrogen und vermindertes Progesteron, vermehrt sich die OT Genexpression im Hypothalamus und Amnion, Chorion und Dezidua (Lefebvre et al., 1992, 1993). Die Sensitivität zu OT steigt durch Hochregulation der OT Rezeptoren (Fuchs et al., 1995). OT und OTR Fluktuationen gibt es während des Menstrualzykluses im Myometrium und Ovar (Silva et al., 1991). Im Humangewebe wurde OTR-mRNA im Ovar, Mamma und Endometrium gefunden, wobei die OTR Expression bei infertilen Frauen deutlich geringer ist als bei fertilen Frauen.

Im Myometrium schwangerer Frauen existiert eine hohe Expression von OTR, die bis zum Ende der Schwangerschaft steigt (Kimura et al., 1992). Die auto- und parakrine Wirkung von OT, um die Prostaglandinsynthese in den Deziduazellen zu erhöhen, wird positiv beeinflusst.

Beim männlichen Geschlecht stehen erhöhte OT Konzentrationen in Hoden und Prostata (Frayne und Nicholson, 1998), in Zusammenhang mit Spermatogenese und Ejakulation.

Das hypothalamische Oxytocin ist verantwortlich für die Milchejektion. Stimuli sind spinale Afferenzen, verursacht durch das Saugen an der Mamille. Offenbar existiert eine negative Korrelation zwischen systemischen OT-Spiegeln und Brustkrebs (Murell, 1995).

Der Wasserhaushalt des Körpers wird unter anderem durch die hypothalamischen Neuropeptide OT und VP reguliert. OT hat etwa 10% der antidiuretischen Wirkung von VP und wirkt auf die Natriumhomöostase durch Reduktion der Na⁺ Resorption am terminalen distalen Tubulus und Sammelrohr (Conrad et al., 1993).

Am Rattenherzen vermindert OT die Frequenz und Kontraktionskraft und stimuliert die ANP Ausschüttung (Favaretto et al., 1997).

2.2.4. Das oxytocinerge System im ZNS

2.2.4.1. OT Lokalisation im ZNS

Im ZNS, wird das OT Gen hauptsächlich in Neuronen der hypothalamischen NSO und NPV exprimiert. Es sind vor allem magnozelluläre Neurone, die OT an Axonterminalen in die Hypophyse ausschütten. Zahlreiche OT Neuronen haben zentrale Projektionen. OT enthaltende Axone befinden sich in folgenden ZNS Arealen der Ratte: dorsomedialer Nukleus, thalamische Kerne, Amygdala, Bulbus olfactorius, Substantia nigra, Locus coeruleus, Raphekerne, Nukleus des Tractus solitarius und Nukleus dorsalis

nervi vagii (Sofroniew, 1985; Buijs et al., 1985). Die OT Konzentrationen im Liquor und im Plasma sind voneinander unabhängig, da OT die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert. NPV Stimulation hat Einfluss auf die Liquor Konzentration von OT (Harris et al., 1981).

Im Hypothalamus sind oxytocinerge Neurone des NSO und NPV verantwortlich für die OT Ausschüttung bei der Laktation (Moos et al., 1989) und im NPV hängt die erhöhte mRNA Expression mit der Einleitung der Geburt zusammen (Broad et al., 1999).

In der Hypophyse reguliert Oxytocin die Sekretion von Prolaktin (Breton et al., 1995) und eine verursacht negative Potenzierung der ACTH Ausschüttung beim Menschen (Page et al., 1990).

2.2.4.2. OTR Lokalisation im ZNS

Versuche an Zellkulturen haben OTR sowohl in hypothalamischen Astrozyten als auch in Neuronen gezeigt (Di-Scala et al., 1995). Die Verteilung von OTR variiert bei unterschiedlichen Spezies:

Bei der Ratte wurden OTR in folgenden Regionen nachgewiesen: in manchen kortikalen Stellen, im Bulbus olfactorius, im Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm, Rückenmark, Nukleus olfactorius anterior, Globus pallidum, und im limbischen System (Stria terminalis, Amygdala und Subiculum ventralis) (Tribollet et al., 1992; Barberis et al., 1996). Durch Radioligandmarkierungen ergab sich eine ähnliche Verteilung der mRNA bei Ratten: In den Somata oder somatanahen Dendriten des/der: Nuklei olfactorii anterior, Tenia tecti, Tuberculus olfactorius, frontaler Kortex, piriformer Kortex, Stria terminalis, Nukleus preopticus anterior medialis (AV3V), magnozellularer Nukleus preopticus, Nukleus supraopticus, Nukleus paraventricularis hypothalamicus, Nukleus retrochiasmaticus, Nukleus hypothalamicus ventromedialis, Nukleus amygdaloideus centralis, Area amygdalohippocampalis, Subiculum, Nukleus hypoglossus prepositalis und im motorischen Anteil des Nukleus dorsalis N. vagus (Yoshimura et al., 1993; Bale et al., 1995b; Yoshimura et al., 1996). Die Genexpression von OT im ventromedialen Hypothalamus, Amygdala, Stria terminalis, Bulbus olfactorius der Ratte hat sich mittels mRNA in situ Hybridisierung nachweisen lassen (Breton und Zingg, 1997). Weitere in situ Hybridisierungstechniken mit [35S]-UDP und [35S]-ADP wurden im Hypothalamus und Thalamus der Ratte erfolgreich angewendet (Ky und Shughrue, 2002). Beim Kaninchen und Hamster fehlen OTR im Hypothalamus und Hypocampus.

Beim Mensch wurde durch Autoradiographie, mit radioaktiv markierten OT Antagonisten, die Lokalisation von OT Bindungsstellen dargestellt (Loup et al., 1991). Es zeigte sich eine vermehrte Bindung in der Pars compacta der Substantia nigra, dafür fehlte sie im Hippocampus, Amygdala und Bulbus. OTR selber wurden im Hypothalamus noch nicht nachgewiesen.

2.2.5. Zentrale Einflüsse des oxytocinergen Systems auf das Verhalten

Zu den peripheren Zielorganen von OT gehören die Geschlechtsorgane, Rattenversuche zeigen, dass es eine enge Beziehung zwischen OT Gabe und Sexualverhalten gibt. So wird die Rezeptivität eines Rattenweibchens, durch Lordose gekennzeichnet, durch OT Infusionsgabe erhöht, oder durch OT Antagonisten supprimiert. Auch das Brutpflegeverhalten wird durch OT positiv beeinflusst (Arletti und Bertolini, 1985; Caldwell et al., 1986; Gorzalka und Lester, 1987; Witt und Insel, 1991; Benelli et al., 1994).

Bei Kaninchen, Ratten und Affenmännchen induziert OT die Erektion und beeinflusst die Ejakulation (Melis et al., 1986; Argiolas, 1992). Die Aktivität der NO-Synthase in hypothalamischen oxytocinergen Neuronen im NPV könnte dafür verantwortlich sein (Melis und Argiolas, 1997). Auch beim Mensch ist ein erhöhter OT Plasmaspiegel, bei sexueller Stimulation und nach dem Orgasmus nachgewiesen worden (Carmichael et al., 1987; Murphy et al., 1990; Carter, 1992), was dafür spricht, dass OT auch im ZNS und nicht nur peripher die Sexualität beeinflusst. Steroidhormone sind in diesem Zusammenhang ein wichtiger Einflussfaktor und ermöglichen die Wirkung von OT (Anderson und Dennerstein, 1994).

OT beeinflusst soziale Faktoren, wie Paarung, soziale Interaktionen und elterliches Schutzverhalten. Dies ist für Säugetiere charakteristisch, es handelt sich um Verhaltensweisen, die sich den ontogenetischen primitiveren Reaktionen (z.B. Stress induzierte Verteidigung etc.) entgegenstellen. Diese letzteren würden dann hervortreten, wenn das Gleichgewicht der ersten (z.B. durch einen Stressfaktor) gestört ist (Henry und Wang, 1998). Das mütterliche Verhalten bei der Ratte wird auch durch OT ausgelöst (Pedersen und Prange, 1979; Richard et al., 1991; Insel, 1992; Pedersen et al., 1992; Nelson und Panksepp, 1998). Diesbezügliche Versuche sind auch bei Nagetieren und Affen durchgeführt worden (Insel, 1992; Pedersen et al., 1992; Williams et al., 1994; Young et al., 1998; Carter, 1998) und zeigen, dass die OT Wirkung auf Verhalten Steroidhormon abhängig ist.

Weiterhin hat das Neuropeptid einen anxiolytischen Effekt und hemmt Stress (Jezova et al., 1995; McCarthy et al., 1996; Uvnas-Moberg, 1998). OT wirkt dämpfend auf das Gedächtnis (Bruins et al., 1992), so dass eine Störung im OT Gleichgewicht mit zentralen Ausfällen einhergehen kann.

2.2.5.1. ZNS-Störungen und Oxytocin

Störungen im oxytocinergen System hängen mit mehreren zentralneurologischen Krankheiten zusammen. Bisher hat sich das bei Essstörungen wie Anorexia nervosa (Demitrack et al., 1990) und

Prader-Willi-Syndrom (Martin et al., 1998) nachweisen lassen, neurodegenerativen Prozessen wie Morbus Alzheimer (Mazurek et al., 1987), sowie psychiatrischen Erkrankungen wie Depression (Purba et al., 1996). Bei der Schizophrenie wurde bei manchen Studien beobachtet, dass eine erhöhte OT Konzentration im Liquor cerebrospinalis vorhanden war (Beckmann et al., 1985), sowie der Spiegel an OT im Plasma kranker Patienten (Legros et al., 1992). Diese Ergebnisse sind jedoch umstritten, da weitere Versuche keine Änderungen nachweisen konnten (Glovinsky et al., 1994).

2.3. SHBG

Steroide beeinflussen die Synthese verschiedener Neuropeptide und deren Rezeptoren, wie z.B. OT und OTR. Es besteht im menschlichen Gehirn ein enger Zusammenhang zwischen Steroidspiegeln und spezifischen Verhaltensmustern.

Steroidhormone passieren wegen ihrer guten Lipidlöslichkeit die Blut-Hirn-Schranke. Im peripheren Blut werden gonadale Steroide durch das in den Sertoli Zellen des Hodens gebildete ABP (Androgen bindendes Protein), oder auch durch das in der Leber synthetisierte SHBG (Steroidhormon-Bindungsglobulin), gebunden und transportiert. Beide Proteine werden auf dem gleichen Gen kodiert, sind aber Produkte einer unterschiedlichen gewebsspezifischen posttranslationalen Modifikation.

2.3.1. Struktur

SHBG, ein Glycoprotein, ist ein Homodimer aus 2 identischen Polypeptidketten mit 367 Aminosäuren und zwei N-Glycosylierungen (Griffin et al., 1989), (Abb. 8). Hybridisationsversuche haben ergeben, dass bei der Ratte durch posttranslationale Prozessierung zwei Monomere von 47 und 41kDa entstehen (Joseph et al., 1987) und im Rattenhypothalamus wurden Fragmente mit 22, 37 und 48 kDa identifiziert (Herbert et al., 2003). Beim Mensch besitzt das Homodimer im Plasma eine Masse von 93 kDa und die Monomere jeweils 46 kDa und 48 kDa. Weitere Strukturforschungen beim menschlichen SHBG hat ergeben, dass pro Monomer eine Steroidbindungsstelle an der N-terminalen G-laminin Domäne vorhanden ist (Avvakumov et al., 2001), und dass am N'-terminalen Ende eine Bindungsstelle für Zink die Affinität des Moleküls zu den verschiedenen Sexual-Steroidhormone beeinflusst (Avvakumov et al., 2000).

2.3.2. Genstruktur

Das Gen besitzt 8 kodierende Exone. Die Produkte der gespleißten mRNA können auch kompetitive Antagonisten der SHBG-Rezeptoren sein (Gerhagen, Lundwall, Fernlund; 1989). Glycosylierungen des Proteins ermöglichen dessen Sekretion aus der Zelle (Sui et al., 1999). Das kodierende Gen für SHBG befindet sich auf dem Chromosom 17 (17p12-p13), (Berube et al., 1990).

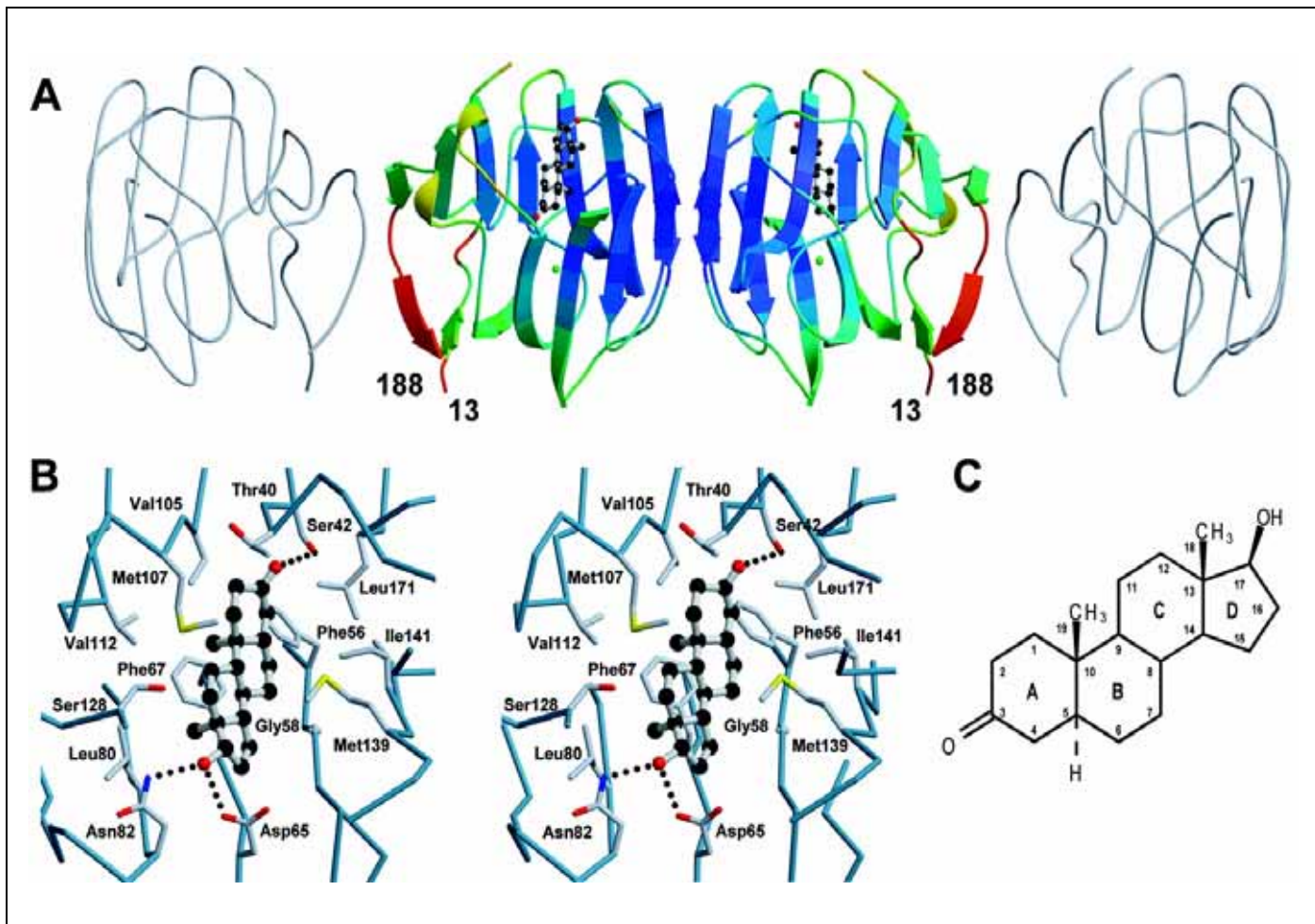


Abb. 8: Die Struktur des SHBG Moleküls nach NIH Database

A: Räumliche Struktur des Homodimers mit seinen 2 Monomeren

B: Konformation des Proteins mit 5α-DHT

C: Sekundärstruktur von 5α-Dihydrotestosteron

2.3.3 SHBG im ZNS

Immunreaktive Androgen bindende Proteine und mRNA wurden schon in Zellkörpern und Fasern des Nukleus supraopticus und paraventricularis, sowie in der Eminentia mediana der Ratte nachgewiesen. Durch unterschiedliches Spleißen der mRNA entstehen hier unterschiedliche Aminosäuresequenzen als im Hoden (Wang et al., 1990). Die topographische Verteilung von SHBG im Rattenhypothalamus wurde weiterhin von Herbert et al., 2001 bestätigt. Western Blotting und Massenspektrometrie zeigen, dass die Monomere von hypothalamischem SHBG dem isolierten testikulären ABP sehr ähnlich sind. In situ Hybridisierung und Northern Blotting zeigen kodierende SHBG mRNA in magnozellulären Neuronen des Rattenhypothalamus.

2.3.4. SHBG und Steroide

Die Produktion von ABP im Hoden wird durch Androgene und FSH reguliert (Hansson et al., 1975; Gunsalus et al., 1981). Das Vorhandensein von SHBG in Zielzellen gonadaler Steroide, wurde schon mehrfach untersucht. Frühe immunhistochemische Studien mit einem polyklonalen Kaninchen Antikörper, zeigen SHBG in der Brustdrüse und in der Prostata. (Bordin und Petra, 1980; Tardivel-Lacombe et al., 1984; Sinnecker et al., 1988; Meyer et al., 1994; Germain et al., 1997). Die mRNA wurde dann später ebenfalls in nichthepatischen Geweben nachgewiesen (Larrea et al., 1993; Misao et al., 1994, 1997; Moore et al., 1996; Muruyama et al., 1999).

In der Peripherie ist die Genexpression des SHBG bei der Maus an Stellen gesteigert, wo höhere Konzentrationen von Steroiden gebraucht werden (Ovarien, Hoden, Gehirn), was darauf hindeutet, dass SHBG und Steroide zusammen deren Bioverfügbarkeit in Zielorganen erhöhen. (Joseph, Power, Petrusz, 1997). Durch Immunhistochemie und RT-PCR an der menschlichen Tuba uterina wurde eine Kolo-kalisation von SHBG mit SHBG mRNA und ER in den gleichen Zellen nachgewiesen (Neo, 1999). Diese Arbeit wurde durch Hryb et al., 2002, in weiteren steroidabhängigen Geweben fortgesetzt (Mamma und Prostata). Sie unterstützt die Hypothese, dass SHBG durch Synthese an der Zielzelle, deren Affinität von Steroide erhöht.

Rattenversuche am Hypothalamus mit verschiedenen Sexualhormonen beweisen den direkten Einfluss von SHBG auf die Sexualität. (Caldwell et al., 2002). Im Hypothalamus von Ratten wird SHBG Expression mittels Gabe von Estradiol supprimiert (Gao et al., 2003). Weiterhin zeigen Versuche mit freiwilligen Männern, dass nach Gabe von Methyltestosteron die peripheren SHBG Plasmaspiegel sinken, aber, dass auch verschiedene psychische Störungen auftauchen (Daly et al., 2003), was auf eine zentrale Verknüpfung von SHBG und Steroiden deutet. Das Vorhandensein von SHBG im menschlichen Gehirn ist jedoch noch nicht nachgewiesen worden.

2.4. Schizophrenie

2.4.1. Klinik

Eugen Bleuler ersetzte 1911 die Bezeichnung „Dementia Praecox“, so genannt wegen der angeblichen „Verblödung“, durch „Schizophrenie“ (=Spaltungsirresein), um eine Gruppe von elementaren Störungen, wie mangelhafte Einheit, Zersplitterung und Aufspaltung des Denkens, Fühlens, Wollens und des subjektiven Gefühls der Persönlichkeiten zusammenzufassen („Spaltung der verschiedensten psychischen Funktionen“).

2.4.1.1. Psychische Veränderungen

Die folgende Liste umfasst psychische Veränderungen, die bei der Schizophrenie auftauchen können (nach Bleuler, 1983).

1. Störungen des Gedankenganges, mit einem Mangel an Zusammenhang zwischen einzelnen Gliedern und einer Beziehungslosigkeit bei der Antwort auf Fragen. Verdichtung, Begriffsverschiebung bzw. Symbolbildung, Zielvorstellungen, Gedankenentzug, Ideenflucht, Verallgemeinerungen können vorkommen.
2. Störungen der Affektivität können eine breite Palette annehmen: von Reizbarkeit und Überempfindlichkeit, bis zur Gleichgültigkeit und Verlust der Modulationsfähigkeit. Es herrscht eine Grundstimmung, wie z.B. Euphorie. Hervorzuheben wäre die Uneinheitlichkeit der Gefühle (Eine Mutter tötet ihr Kind, das sie als eigenes liebt, aber als das ihres ungeliebten Mannes hasst.).
3. Ambivalenz (z.B. gleichzeitiges Weinen und Lachen)
4. Autismus mit Verlust des Kontaktes zur Realität und Bildung einer eigenen Welt mit Verfolgungswahn oder Wahnideen.
5. Störungen des Willens und Handelns: der Patient leidet unter Willensschwäche, häufig tritt aber ein launischer Eigensinn auf, oder es entstehen Zwangshandlungen und Automatismen.
6. Störungen der Person: die depersonalisierte Person kann nicht mehr frei denken und empfindet alles verändert, oder nimmt eine fremde Person bei der seltenen Appersonierungen ein.
7. Akustische Halluzinationen sind ein entscheidendes Kriterium für die Diagnose und stehen in enger Verbindung mit Depersonalisation und Gedankenentzug. Sinnestäuschungen sowie Änderungen der Orientierung und des Gedächtnis können ebenfalls vorkommen.
8. Wahnideen

2.4.1.2. Positiv- und Negativsymptomatik

Der Mangel an sozialer Kompetenz und kognitiver Leistungsfähigkeit eines Schizophrenen ist auch in nicht psychotischen Phasen vorhanden. Das Fehlen dieser Fähigkeiten wird als „Negativ-Symptomatik“ betrachtet und ist erheblich durch Neuroleptika beeinflussbar. Hierfür wird das mesolimbische System verantwortlich gemacht.

Als „Positiv Symptomatik“ werden alle Zusatzerscheinungen bezeichnet, wie z.B.: Halluzinationen und Wahnideen, die in einem psychotischen Schub zum Vorschein kommen und durch Dysfunktion des präfrontalen Kortex hervorgerufen werden. Diese Symptome sprechen auf Neuroleptika gut an (Möller, 2001).

2.4.1.3. Diagnose

Zur Diagnosestellung werden operationalisierte Diagnosesysteme verwendet, wie die ICD-10 oder DSM-IV. Sie legen die Diagnose der Schizophrenie durch einen Kriterienkatalog fest, der Symptome und Mindestdauer der Erkrankung angibt, fest. Die Liste (siehe Abb. 9) gibt diesen Katalog in modifizierter Form wieder (nach Möller, 2002).

Abb. 9: Schizophrene Erkrankungen nach ICD-10 und DSM-IV

ICD-10

- Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Wahnwahrnehmung
- Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen
- Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Beeinflussungserlebnisse, Zerrahrenheit, Gedankenabreissen u. a.
- katatone Symptome
- negative Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter Affekt
- eine charakteristische Symptomatik muss mindestens ein Monat vorliegen
- keine nachweisbare organische Ursache

DSM-IV

- Wahn, besonders bizarrer Wahn, stimmungsinkongruente Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen
- Zerrahrenheit
- katatone Symptome
- Affektarmut, Antriebsmangel, sozialer Rückzug
- Verschlechterung der sozialen Adaptation
- kontinuierliche Anzeichen der Erkrankung für mindestens 6 Monate
- keine nachweisbare organische Ursache

2.4.2. Ätiopathogenese

Laut Zwillingsstudien gibt es Anhaltspunkte zu einer genetischen Prädisposition zur Entstehung einer schizophrenen Symptomatik. Bei vielen Patienten existiert eine frontale Hirnrindenatrophie mit Vergrößerung der Hirnventrikel. Prä- und Perinataalkomplikationen werden als wahrscheinliche Ursache dafür diskutiert.

2.4.2.1. Dopamin und das Weinberger Modell

Aus biochemischer Sicht wird eine Überaktivität zentralnervöser dopaminerger Strukturen im mesolimbischen System als Korrelat akuter schizophrener Psychosen diskutiert. Unterstützt wurde diese Hypothese durch pharmakologische Befunde, die zeigen, dass Neuroleptika über die Blockade postsynaptischer Dopamin-D2-Rezeptoren ihre antipsychotische Wirksamkeit entfalten. Es besteht die Möglichkeit einer veränderten D2-Rezeptor Regulation. PET-Scans von schizophrenen Patienten zeigen einen erhöhten D2ab Metabolismus im Nukleus caudatus, accumbens und Bulbus olfactorius (aus Kandel, 1991).

1987 erstellte Weinberger ein Modell zur Erklärung der Schizophrenie:

Bei einem Gesunden sendet die Medulla oblongata Signale zum präfrontalen Kortex über die dopaminergen mesocorticalen Bahnen und zum limbischen System durch dopaminerge mesolimbische Bahnen. Der präfrontale Kortex sendet wiederum inhibitorische Signale an das limbische System und die Medulla oblongata. Störungen im dopaminergen System würden die mesocorticale Bahn negativ beeinflussen, was nicht nur für die negativ Symptomatik verantwortlich sein könnte, sondern es würde auch das negative Feedback fehlen und die mesolimbische Bahn hochreguliert, welches durch Hyperaktivierung des limbischen Systems die Positivsymptomatik hervorrufen könnte (aus Kandel, 1991). Die Dopaminhypothese zur Entstehung der Krankheit ist aber noch nicht ausreichend belegt und sicherlich spielen weitere Faktoren eine Rolle.

2.4.2.2. Schizophrenie und OT

Wegen der Eigenschaft, bestimmte Verhalten und Lernprozesse zu beeinflussen, wurde das oxytocinerge System als möglicher Erkrankungsfaktor bei der Entstehung der Schizophrenie, erforscht. Durch eine 1983 durchgeführte Studie ergab sich eine leicht erhöhte OT Konzentration im Liquor cerebrospinalis schizophrener Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (Beckman et al., 1985). Das OT-assoziierte Neuropeptin I im Plasma kranker Patienten wurde von Legros et al. (1992) sogar dreifach über die Norm erhöht gemessen. Mit Radioimmunassays wurde Neuropeptin neben anderen Hirnarealen auch im NPV des Hypothalamus gemessen. Es wurden zwar große Schwankungen der Neuropeptingehalte bei

gesunden Kontrollen beobachtet, bei Schizophrenen aber ergaben sich stark veränderte Werte, was auf eine Störung im oxytocinergen System zurückzuführen sein könnte (Mai et al., 1993). Allerdings beobachteten Glovinsky et al. (1994) im Liquor cerebrospinalis keine Veränderungen der OT-Gehalte bei Schizophrenen.

Andere Versuche messen Störungen der OT Spiegel in Zusammenhang mit anderen Enzymen oder Transmittern. Blockierung des dopaminergen Systems durch Apomorphine führt beim Schizophrenen zu einer viel größeren OT/NP Ausschüttung als beim Gesunden (Legros et al., 1992).

Weiterhin wurde die bekannte Aktivität der NO-Synthase in oxytocinergen Neuronen im NPV beim Schizophrenen analysiert. Eine verminderte Produktion von NO-Synthase in CRH bildenden parvozellulären Neuronen und in OT und VP produzierenden Neuronen des schizophrenen Hypothalamus (Bernstein et al., 1998), könnte einen regulierenden Einfluss auf die Produktion dieser Hormone beim Schizophrenen andeuten.

Ein Zusammenhang der Schizophrenie, einhergehend mit Störungen im dopaminergen System und glutaminergen inhibitorischen Mechanismen, ist bekannt (s.o.). Die Wirkung von OT auf PPI (Prepulse Inhibition) als Maß für sensomotorisches Gating und herabgesetzte Inhibitionen im Gehirn, assoziiert mit der psychotischen Krankheit wurde nach Gabe von Dopamin oder NMDA-Antagonisten gemessen. Der Einfluss des Neuropeptids spricht für eine Rolle des oxytocinergen Systems in der Ätiopathogenese der Schizophrenie (Feifel und Reza, 1999).

3. Zielsetzung

Der Hypothalamus, Regulationszentrum vegetativer Funktionen und Koordinationszentrum für Verhaltensweisen, bildet im NSO und NPV unter anderem auch OT. Bei den Tiermodellen übernimmt das oxytocinerge System eine wichtige Rolle bei der Regulation von Verhaltensweisen, die durch Sexualsteroiden moduliert werden. Störungen im OT System hängen mit zentralnervösen Krankheiten zusammen, möglicherweise auch mit Schizophrenie.

Die Regulationsmechanismen des OT sind sehr komplex und beschränken sich nicht nur auf die geregelte OT Genexpression, sondern hängen auch von seiner Bioverfügbarkeit am Zielorgan und somit von der Expression von OTR ab. Diesbezügliche histochemische Untersuchungen beim Mensch existieren noch nicht und waren zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit.

Das OTR Gen wird beim Tier je nach Hirnareal mit komplexen regionspezifischen Mechanismen induziert, unter denen die Steroidhormone einen großen Stellenwert einnehmen. Bisher wurde OTR sowie die entsprechende Genexpression bei verschiedenen Tieren in vielen ZNS Arealen nachgewiesen, die mit Verhaltensfunktionen eng verknüpft sind.

SHBG wirkt in der Peripherie nicht nur als Transportglobulin für Sexualsteroiden, sondern erhöht die Affinität in Organen zu Steroiden durch gesteigerte SHBG Genexpression und Synthese. Versuche haben beim Tier SHBG im Hypothalamus nachgewiesen und dessen Einfluss auf das Sexualverhalten erforscht. SHBG im humanen Gehirn ist bisher noch nicht nachgewiesen worden. Die Verfügbarkeit der Steroidhormone im Hypothalamus und deren Einfluss auf das oxytocinerge System könnte mit der Existenz eines Sexualhormon bindenden Globulins im menschlichen Hypothalamus verknüpft sein.

Ziel dieser Arbeit war es, OTR und SHBG in magnozellulären Neuronen des Nukleus supraopticus und des Nukleus paraventricularis nachzuweisen. Die Kollokalisierung der OT bildenden Zellen mit OTR und SHBG wurde mit immunhistochemischen Doppelfärbungen untersucht.

Des Weiteren wurde ein morphologischer Vergleich der OT und OTR enthaltenden Zellen im NSO und NPV schizophrener Patienten gegenüber Gesunden durchgeführt, um den Einfluss des OT und seiner Regulationsmechanismen bei der Entstehung der Krankheit näher zu kommen.

4. Material und Methoden

4.1. Untersuchtes Material

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines europäischen Projektes zur Erforschung der Schizophrenie durchgeführt. Gehirne von verstorbenen Schizophrenen wurden in der Abteilung Neuropathologie im Zentrum für Psychiatrie in Wiesloch in Formalin konserviert. Gehirne von Verstorbenen ohne pathologischen Befund dienten als Kontrollen. Das Votum der Ethikkommission liegt vor (Bearbeitungsnr. 1065-03/03). In Jena wurden histochemische Untersuchungen durchgeführt.

Die untersuchten Hypothalami entstammen 5 schizophrenen Patienten und 7 Kontrollen. Das Alter der Verstorbenen schwankte zwischen 55 und 87 Jahren. Die post mortem Zeit liegt in einem Bereich zwischen 1h45min und 71h30min. In den Akten befanden sich keine Angaben zur Therapie und Neuroleptikabehandlung der Patienten. Die Fixierung in 10% Formalin erfolgte über mindestens 3 Monate.

Schizophrene Gruppe	Geschlecht	Alter (Jahre)	Post mortem Zeit zur Sektion
Schizophren 1	weiblich	58	20h00min
Schizophren 2	männlich	75	1h45min
Schizophren 3	weiblich	82	5h15min
Schizophren 4	weiblich	84	17h45min
Schizophren 5	männlich	87	17h30min
Mittelwert		77,1	12h27min
Median		82	17h30min

Kontrollgruppe	Geschlecht	Alter (Jahre)	Post mortem Zeit zur Sektion
Kontrolle 1	männlich	55	18h30min
Kontrolle 2	männlich	56	20h55min
Kontrolle 3	weiblich	56	20h25min
Kontrolle 4	weiblich	63	8h30min
Kontrolle 5	männlich	68	17h30min
Kontrolle 6	männlich	70	71h30min
Kontrolle 7	weiblich	71	27h15min
Mittelwert		62,7	26h22min
Median		63	20h25min

Die Hypothalami wurden aus denen in Formalin konservierten, Gehirnen herauspräpariert und die entsprechenden Nuklei paraventriculares und Nuklei supraoptici selektiert. Die Gewebestücke wurden dann in PBS gewaschen und in Eponharz eingebettet.

4.2. Eponeinbettung

Die Gewebestücke mit einer Kantenlänge von 3-5mm wurden in PBS gespült und über eine Alkoholreihe entwässert (jeweils 2h in 50%, 70%, 90% und 100% Ethanol). Als Intermedium diente Propylenoxid (zwei mal je 1h bei Raumtemperatur).

Es wird ein Epongemisch hergestellt. Dieses besteht aus 13,0g Epon 812, 4,9g Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (Epon-Härter DDSA) und 8,9g Methylnadid anhydrid (Eponhärter MNA). Die Bestandteile müssen gut gemischt werden. Danach werden 0,8g 2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol (Epon-Beschleuniger DMP-30) dazu gegeben (alle Komponenten sind von der FLUCA A.G.). Die Gewebestücke werden in Epon-Propylenoxid gebracht.

Das Epongemisch wird dann mit Propylenoxid gemischt. Zuerst wird eine Einheit innerhalb von einer Stunde in vier Einheiten Propylenoxid versetzt, dann eine weitere Stunde mit zwei Einheiten Propylenoxid und zuletzt in einer Einheit über Nacht im Kühlschrank gelassen.

Am nächsten Tag wird frisch zubereitetes Epongemisch in Einbettungsförmchen aus Silikon Kautschuk gegossen und die Proben werden darin eingebettet. Das Epon mit den Gewebestücken härtet dann über eine Woche bei 60°C aus. Aus den gehärteten Blöcken werden dann in 1µm dünne Serienschnitte mit einem Reichert Ultraint Mikrotom angefertigt und auf einem Objektträger aufgetragen.

Ein Objektträger enthält drei konsekutive Schnitte, von 1µm Breite, eines Gewebestückes. Da dies nur 4% des Durchmessers eines hypothalamischen magnozellulären Neurons sind, können identische Zellen, durch einfachen Vergleich bei unterschiedlicher Markierung der aufeinander folgenden Schnitte, beobachtet werden.

4.3. Immunhistochemische Färbung von Eponschnitte

Das Entharzen der Schnitte erfolgt in folgenden Lösungsmitteln jeweils 3 min: methanolische NaOH (Harz wird durch Hydrolyse aufgelöst), Methanol-Benzol (Polymere werden gebrochen) und 2 mal in Aceton (Monomere werden aufgelöst). Die Schnitte werden danach in PBS abgespült.

Da das tierische Gewebe auch kleinere Mengen einer endogenen Peroxidase besitzt, würde diese mit H_2O_2 und DAB reagieren und unspezifische Färbungen hervorrufen. Um diese unerwünschte Reaktion zu verhindern, wird das endogene Enzym durch ein Gemisch aus Methanol (5mL), 30% Wasserstoffperoxid (500 μ L), PBS (50mL) während eines Zeitraums von 30 min bei Raumtemperatur blockiert.

Nach waschen in PBS werden die Schnitte in 2% Normal Human Serum innerhalb von 10 min präinkubiert, um Proteinbindungsstellen abzusättigen.

Die erste Inkubation erfolgt mit Kaninchen-anti-NP I (Chemicon), Maus monoklonaler Antikörper gegen humanes SHBG (Lewis et al., 2002), Ziegen-anti-OTR (Chemicon). Der jeweilige Antikörper wird in PBS verdünnt (1:1000 für anti-NP I, 2:3 für anti-SHBG und 1:200 für anti-OTR). Die Inkubation der Schnitte erfolgt über Nacht bei 4°C.

Die Schnitte werden danach in PBS gewaschen, um überflüssige, nicht gebundene Antikörper und andere Reste wegzuspülen.

Eine zweite Inkubation erfolgt mit 1:200 verdünnten anti-Kaninchen IgG (ein von Ziegen abstammendes Immunglobulin (SIGMA)), anti-Maus IgG (ein von Ziegen abstammendes Immunglobulin (SIGMA)), oder anti-Ziegen IgG (ein von Kaninchen abstammendes Immunglobulin (SIGMA)), welches an die Fc-Teile der primären Antikörper bindet, innerhalb von 45 min bei Raumtemperatur.

Daraufhin erfolgt wieder ein Abspülen der Schnitte in PBS.

Die Inkubation mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP), (in Kaninchen (NP und SHBG) oder Kaninchen (OTR) Serum gewonnen), erfolgt auch innerhalb von 45 min bei Raumtemperatur.

Nach weiterem Abspülen in PBS werden die Schnitte schließlich in DAB gefärbt (2mg DAB Pulver werden in 10mL PBS gelöst und 2-4 μ L H₂O₂ hinzugefügt). Nach weiteren 10 min werden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült.

Nach Entwässern der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol, und schließlich Xylol), werden diese mit einem Tropfen Entellan (Merck) und mit einem Deckgläschen bedeckt.

4.4. Affinitätschromatographie

Tiefgefrorenes Hypothalamusgewebe (-80°C) vom Institut für Anatomie, wird beim Auftauen mit einem Homogenisierstab in sterilem PBS homogenisiert. Weitere Homogenisation erfolgt mit Ultraschall. Das Homogenat wird zentrifugiert, die obere Phase entnommen und so vom zellulären Debris getrennt. Das Proteinkonzentrat muss zwischen 0-10°C gekühlt aufbewahrt werden, um die Proteaseaktivität zu verhindern.

Das Protein A ist ein bakterielles zellwandassoziiertes Protein von *Staphylococcus aureus*, welches zu den Pathogenitätsdeterminanten gehört und bindet an den Fc-Teil des humanen IgG. 250mg Protein A-Sepharose (SIGMA) werden in 5mL PBS aufgetrennt. Das Gel wird 30 min bei Zimmertemperatur quellen gelassen.

Eine 1mL Tuberkulinspritze wird nach Entfernen des Stempels mit einer kleinen Menge Glaswolle versehen, um das Gel zu halten. Nach Montage an einem Säulenhalter wird das Sepharosegel vorsichtig eingefüllt.

200µL Anti-Human SHBG (monoklonaler Antikörper 11F11, Lewis et al., 2000) wird auf die Säule aufgetragen. Eine Bindung an die Säulenmatrix erfolgt innerhalb von 2h bei Zimmertemperatur. Dazu wird die Säule unten verschlossen. Danach wird die Säule mit PBS gewaschen.

Das Gewebehomogenat (200µL des Überstandes) wird auf die Säule aufgetragen. Eine Bindung erfolgt innerhalb von 2h bei Zimmertemperatur.

Danach wird die Säule mit PBS erneut gewaschen. Einzelne Tropfen des Eluates werden auf eine Kunststoff-Blotmembran aufgebracht (Cyto GmbH Gießen) und mit Coumassie Blau (250mg) gefärbt, um das Vorhandensein von Proteinen festzustellen. (250mg Coumassie Blau (Biorad), 10mL Methanol, 15mL 100% Essigsäure, 74mL PBS, 1mL TritonX 100). Sobald die Blots ungefärbt bleiben, ist der Waschvorgang abgeschlossen. Gebundenes SHBG wird mit 5mL NaAcetat Puffer pH=4,0 eluiert. Danach wird die Säule mit PBS durchgespült (ca. 10mL) und ist anschließend bereit für eine weitere Inkubation mit dem Gewebehomogenat.

Eluate werden gesammelt und über Nacht bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert (Dialysemembran Dow Corning, Ausschussvolumen 10kDa). Das Dialysat wird danach lyophilisiert (Speedvac Zentrifuge ca. 5h).

4.5. SDS Elektrophorese und Western Blot

4.5.1. Prinzipien und Ziele

Ziel der SDS Elektrophorese ist die Auftrennung von Proteinzusammensetzungen und ihre Identifikation anhand des Molekulargewicht.

Prinzip:

SDS (Sodium dodecyl sulfate) ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung der Proteine so effektiv deckt, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheiten entstehen.

Bei der Elektrophorese mit Polyacrylamidgel wandern die Proteine in Richtung der Anode. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte, der Proteine und der Wanderungstrecken der SDS Polipeptidmizellen. Durch Vergleichsstandards, die auf das Gel aufgetragen werden, können die Molekulargewichte, der Proteine bestimmt werden.

Ziel des Western Blottings ist die weitere Identifikation der aufgetrennten Proteine durch Isolierung und spezifische Markierung.

Prinzip:

Die aufgetrennten Proteine werden weiterhin elektrophoretisch auf der Membran aus Nitrocellulose unter dem Einfluss eines isoelektrischen Feldes transferiert und dann immobilisiert. Schließlich werden die Proteine durch spezifische Antikörper-Bindung und weitere immunhistochemische Färbung nachgewiesen.

4.5.2. Protokoll

Vorbereitung der Elektrophorese:

Das Trenngel Acrylamid 10% wird zwischen den Glasplatten eingegossen und mit destilliertem Wasser aufgefüllt, um eine horizontale Linie zu erzeugen. Nach 10 min ist das Gel polymerisiert und das Wasser kann entfernt werden. Jetzt werden die Platten mit Sammelgel (2% Acrylamid) aufgefüllt und die Kämme eingesteckt. Nach der Polymerisation werden die Kämme entfernt, das Gel entnommen und in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Die Elektrophoresekammer wird mit Elektrodenpuffer gefüllt.

Die lyophilisierten Proben werden pro 10µg mit 40µL Probenpuffer gelöst und bei 95°C abgekocht. Der Marker (Novagen) wird ohne Kochen direkt in die Geltasche (5-6 µL) aufgetragen.

Elektrophorese:

Nach Übertragung der Proben und Marker in die Geltaschen erfolgt die Elektrophorese zuerst bei 100mV durch das Sammelgel und dann innerhalb von 60 min bei 150mV durch das Trenngel. Die Proteine wandern mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten im Verhältnis zu ihrer Masse Richtung Anode. Die Trennung der Proteine wird anhand der Wanderung der Markerbanden beobachtet. Danach wird der Puffer abgeschüttet. Nach dem Durchlauf wird das Gel über Nacht in Coumassie Blau gefärbt, danach in Essigsäure der überflüssige Farbstoff abgespült. Das gefärbte Gel wird zwischen zwei Zellophanstreifen getrocknet und aufbewahrt. Ein weiteres Gel wird für den Western Blot wie oben beschrieben hergestellt. Dieses Gel bleibt ungefärbt.

Western Blot:

Die Nitrocellulosemembran (Serva, Porengröße 0,45µm), das Gel und die Filterpapiere werden in Transferpuffer getränkt.

Die Schichtung im Blot erfolgt dann folgenderweise:

- Anode
- Filterpapier
- Membran
- Gel
- Filterpapier
- Katode

Durch Einwirkung des elektrischen Feldes, trennen sich im Transferpuffer die Proteine vom schnellerlaufenden SDS. Die Übertragung der Proteine erfolgt bei 20V und 500mA innerhalb von 40 min.

Die Proteine werden in der Nitrozellulosemembran gebunden.

Die Membran wird dann mit Ponceau Rot 15 min lang gefärbt, um den Erfolg des Blots zu überprüfen.

Danach wird die Membran mit Leitungswasser gewaschen, bis die Färbung verschwindet.

Die Membran wird für die Dauer von 60 min mit 2% Milchpulver blockiert.

Die Inkubation mit anti-SHBG 7H9 (Lewis et al., 2000), (Verdünnung 1:2) erfolgt über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dann in PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper anti-Maus IgG (SIGMA), (Verdünnung 1:100) inkubiert 1h bei Raumtemperatur.

Nach einem weiteren Waschvorgang in PBS-Triton, wird der Blot mit PAP-Komplex in PBS-Triton 1:100, 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wird danach mit PBS-Triton gewaschen und mit DAB-H₂O₂, wie oben beschrieben, innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Der fertige Blot wird danach in Wasser gewaschen.

4.6. Auswertung

4.6.1. Kriterien zur Auswahl der Schnitte

Es wurden ca. 150 Objektträger mit je 2 oder 3 Schnitten von insgesamt 13 Patienten immunhistochemisch gefärbt und mit einem Olympus BX50 Mikroskop analysiert. Zunächst wurden unverwertbare Schnitte aussortiert, nach folgenden Kriterien: zerstörtes Gewebe, welches das Erkennen von magnozellulären Neuronen erschwert oder wo bestimmte Zellkörpergruppen nicht mehr sichtbar waren, außerdem wurden überfärbte Schnitte aussortiert. Die verwerteten Schnitte hatten keine Hintergrundfärbung, bestanden aus gut erhaltenem Material mit erkennbaren anatomischen Strukturen, wie Blutgefäßen, Gliazellen, Nervenendigungen, eventuell Ventrikelwand, magnozelluläre Neurone mit erkennbarem Zellkern und Fasern.

4.6.2. Auszählung der Präparate

Nachdem eine randomisierte Präparatstelle mit einer Olympus DP 10 Kamera fotografiert und auf einen Computer übertragen wurde, konnte die Anzahl markierter Zellen mit Hilfe einer Software von Olympus, Namens DP Soft, gezählt werden. Es werden dazu Zellen gezählt, deren Färbung sich deutlich von der Hintergrundfarbe abhebt.

Es ist davon auszugehen, dass Neuropeptid bildende Neurone gleichmäßig in den hypothalamischen Nuklei verteilt sind. Durch Zählen der Zellkerne wurde die Gesamtanzahl der Neurone pro Gesichtsfeld ermittelt und der Prozentsatz der gefärbten Zellen ermittelt.

4.6.3. Vergleich der Hypothalami gesunder und schizophrener Patienten

Es wurden der NSO und NPV von 5 Hypothalami schizophrener Patienten mit denen von 7 gesunden Kontrollen verglichen. Sowohl die Anzahl OT enthaltender Zellen sowie OTR-positiver Zellen pro Schnitt wurde ausgewertet. Hierzu wurden Flächen von $120000\mu\text{m}^2$, nach dem Fotografieren bei einer Vergrößerung von 20x ausgezählt. Da die Stichproben klein sind und die Werte nicht einer Normalverteilung folgen, wurden Unterschiede der statistischen Werte zwischen Schizophrenen und Kontrollen, dem für unabhängige Variablen geeigneten Wilcoxon-W-Test unterzogen (mit Unterzuhilfenahme des SPSS Programms), um deren exakte Signifikanz auszurechnen.

4.6.4. Auswertung der Kolokalisation verschiedener Neuropeptide

Serien von 1µm dünnen Kunstharzen wurden jeweils mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. Dadurch war es möglich, in Folgeschnitten die Kolokalisation von SHBG, OT und OTR zu rekonstruieren. Für die Auswertung werden die Zellen wie oben beschrieben gezählt.

4.7. Materialien

4.7.1. Materialien für die Eponeinbettung

Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid

(Epon-Härter DDSA)

C₁₂ H₂₃ CH-CH₂COOCO

Ferak Berlin

MG 266,38

2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol

(Epon-Beschleuniger DMP-30)

Ferak Berlin

MG 265,40

Epon812

Viskosität: 0,9-1,5 cps (25C°)

Methylnadic anhydrid

(Eponhärter MNA)

endo-methylen-tetrahydromethylphtalsäureanhydrid isomerengemisch

4.7.2. Materialien der Immunhistochemie

4.7.2.1. Entharzungslösung:

Methanolische NaOH

200mL Methanol

20g NaOH

Entstandene Lösung mit ca. 100mL Methanol auffüllen bis Emulsion sich auflöst.

100mL Benzol

Methanol-Benzol

Benzol und Methanol 1:1.

Aceton

>99,5% Firma Rot, Nr: 93724

4.7.2.2. Antikörper

Antikörper	hergestellt in:	Eigenschaft:	Nummer:	Firma:	Verdünnung:
Anti-Oxytocin Rezeptor (C-20)	Ziege	polyklonales ImmunglobulinG	cat sc-8102 Lot E091, 200µg/mL	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Anti-Oxytocin	Kaninchen	polyklonales ImmunglobulinG	AB 911 Lot 21100786, 100µL	CHEMICON International	1:1000
Anti-Neurophysin I	Kaninchen	polyklonales ImmunglobulinG	AB 948 Lot 189395263, 100µL	CHEMICON International	1:1000
Anti-SHBG	Maus	monoklonales ImmunglobulinG	Klon 16D5	Autor: John Lewis, University of Christ Church Neuseeland	2:3
Anti-SHBG	Maus	monoklonales ImmunglobulinG	Klon 11F11	Autor: John Lewis, University of Christ Church Neuseeland	Affinitäts-chromatographie
Anti-SHBG	Maus	monoklonales ImmunglobulinG	Klon 7H9	Autor: John Lewis, NZ University of Christ Church Neuseeland	1:2 für Western Blot
Anti-goat IgG: (anti-Ziege)	Kaninchen	polyklonales ImmunglobulinG	G-4018 Lot 119H4830, 1mL	SIGMA	1:100
Anti-rabbit IgG (anti-Kaninchen)	Ziege	polyklonales ImmunglobulinG	R-2004 Lot 126H8895, 2mL	SIGMA	1:100
Anti-mouse IgG (anti-Maus)	Ziege	polyklonales ImmunglobulinG	M-5899 Lot 99H4865, 2mL	SIGMA	1:100
PAP(Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex)	Ziege		P-1901 Lot 116H8806, 1mL	SIGMA	1:100
PAP	Kaninchen		P-2026 Lot 94H8828, 2mL	SIGMA	1:100

4.7.2.3. Pufferverzeichnis und Chemikalien der IHC

PBS:

5x PBS 67mMolar

- 46,6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 9,0g KH_2PO_4
- 45,0g NaCl

⇒ auf 1L mit destilliertem H_2O auffüllen

⇒ für den Gebrauch 1:4 verdünnen

DAB Peroxidase:

3,3'-Diaminobenzidin Tabletten
In 1mL H_2O

DAB, 0,7mg/mL

H_2O_2 , Urea 1,6mg/mL

D-4168 Lot42K8204

Firma: SIGMA

4.7.3. Materialien der SDS Elektrophorese

4.7.3.1. Apparatur:

Elektrophorese: Mini-V 8.10 Gibco BRL Vertical Gbl Electrophorese Apparat
Firma: Life Technologies

Tankblott: Mini-V 8.10 Blot module Serie: 21078
Firma: Life Technologies

4.7.3.2. Reagentien:

Acrylamid und N,N'-methylenbisacrylamid

polymerisiert zur Bildung eines Geles.

4.7.3.3. Gel- und Pufferherstellung

10%iges Trenngel

4mL H_2O

2,5mL Trenngelpuffer

3,33mL Acrylamid

50 μL Persulfat 10%

10 μL TEMED (N,N,N',N'-tetramethhyldiamin)

Trenngelpuffer (pH=8,8)

45,8g Tris

60mL 1Molar HCl

1g SDS (Sodium dodecyl sulfate)

⇒ auf 250mL mit H₂O auffüllen.

Sammelgelpuffer (pH=6,8)

6,05g Tris

48mL 1Molar HCl

0,4g SDS

⇒ auf 100mL mit H₂O auffüllen

Elektrodenpuffer (pH=8,3)

12,6g Glycin

3,0g Tris

1,0g SDS

⇒ auf 1L mit H₂O auffüllen

Probenpuffer

1mL 1Molar Tris

0,5mL 1Molar HCl

37mg EDTA-Na⁺

1g SDS

10g Saccharose

1mL Bromphenol 1%

5mL Mercaptoethanol

Protein Marker für die Elektrophorese

NOVAGEN Perfect Protein Markers, 15-150kDa

Lot Nr. N34481

(hergestellt sind 500µL des Markers in 125mM Tris HCL pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 200mM 2-Mercaptoethanol, 0,007% Bromphenol Blau)

Enthält rekombinante Proteine mit Molekulargewichten von 15000, 25000, 35000, 50000, 75000, 10000 und 150000 Da.

5. Ergebnisse

5.1. Nachweis von OTR und SHBG im Hypothalamus des Menschen

Im Nukleus paraventricularis des Hypothalamus war OTR in Zellen vorhanden, deren Perikaryon einen Durchmesser von ca. 15µm hat. Diese sind die Zellkörper der magnozellulären Neurone, deren Färbung sich entweder zytoplasmatisch homogen darstellte, oder als perinukleäre Feingranulierung (Abb. 13). Axonale Varikositäten waren selten zu sehen und enthielten dann eine periphere Feingranulierung. Kleinere Zellen (parvozellulären Neurone) mit 10µm Durchmesser zeigten auch teilweise eine homogene zytoplasmatische Anfärbung. Im NPV gesunder Kontrollen waren 39% der Zellen immunhistochemisch OTR markiert. Die Zellkerne waren immer ungefärbt.

Wie im NPV sind auch im NSO die Perikarien einiger der magnozellulären Neuronen im Zytoplasma angefärbt, entweder homogen oder granuliert. Im NSO ist die Zahl axonaler Auftreibungen sehr viel größer. Diese sind homogen angefärbt, manchmal ist eine membranäre Granulierung sichtbar (Abb. 14). Im NSO ist teilweise das Zytoplasma der parvozellulären Neurone auch angefärbt. Im NSO gesunder Kontrollen waren 43% der Zellen OTR immunhistochemisch markiert. Färbungen der Zellmembran war nur in seltenen Fällen zu beobachten.

OTR ist im Infundibulum nach unseren Beobachtungen kaum vorhanden. Einzelne Fasern färben sich sehr schwach an, angefärbte Zellkörper fehlten.

Schnitte, die zur Kontrolle ohne Inkubation mit Primärserum angefärbt wurden, zeigten keine Färbung.

Hypothalamische NPV, NSO und Infundibulumschnitte wurden mit anti-SHBG immunhistochemisch gefärbt, um die Lokalisation des Proteins darzustellen. Die spezifische Färbung war auf das peri-nukleäre Zytoplasma begrenzt, Kerne waren immer ungefärbt.

Im NPV waren immunhistochemisch markierte Zellen diffus verteilt. Angefärbte magnozelluläre Zellen zeigten eine homogene oder eine granuläre braune zytoplasmatische Farbe (Abb. 10). Wenige Axone waren homogen angefärbt. Keine der parvozellulären Neuronen enthielten SHBG.

Im NSO wurde eine Feingranulierung oder homogene Anfärbung in manchen magnozellulären Zellen beobachtet (Abb. 11). Im NSO war die Zahl angefärbter axonaler Varikositäten höher als im NPV.

Im Infundibulum zeigte sich an manchen Stellen eine sehr deutliche SHBG-Immunomarkierung (Abb. 12). Auch hier waren immungefärbte Zellen nicht sichtbar.

Negativ Kontrollen mit humanem Normalserum statt des SHBG Primärserums zeigten keine Anfärbung.

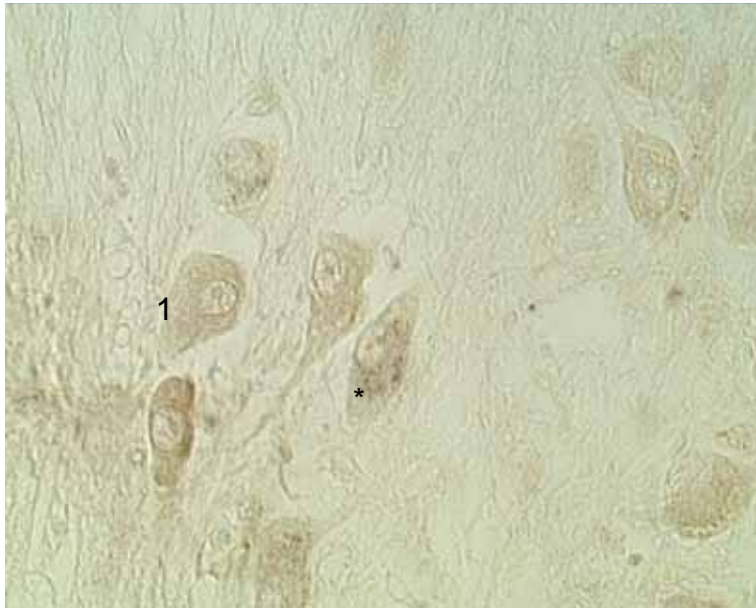


Abb. 10: SHBG in magnozellularären Neuronen des NPV

100-fache Vergrößerung eines immunhistochemischen Schnittes durch den NPV. Darstellung von SHBG in sichtbaren Zellkörpern der magnozellularären Neuronen enthalten zytoplasmatisch homogene Färbung (1), sowie eine zytoplasmatische Feingranulierung (*).



Abb. 11: SHBG in magnozellularären Neuronen des NSO

100-fache Vergrößerung eines immunhistochemischen Schnittes den NSO. Darstellung von SHBG in sichtbaren Zellkörpern der magnozellularären Neuronen enthalten eine zytoplasmatische homogene Färbung (1) sowie eine zytoplasmatische Feingranulierung (*).



Abb. 12: SHBG in Axone des Infundibulums

100-fache Vergrößerung eines immunhistochemischen Schnittes durch das Infundibulum. Dargestellt wird SHBG in zahlreichen Axonen (*): 3 Beispiele angefärbter Axone.

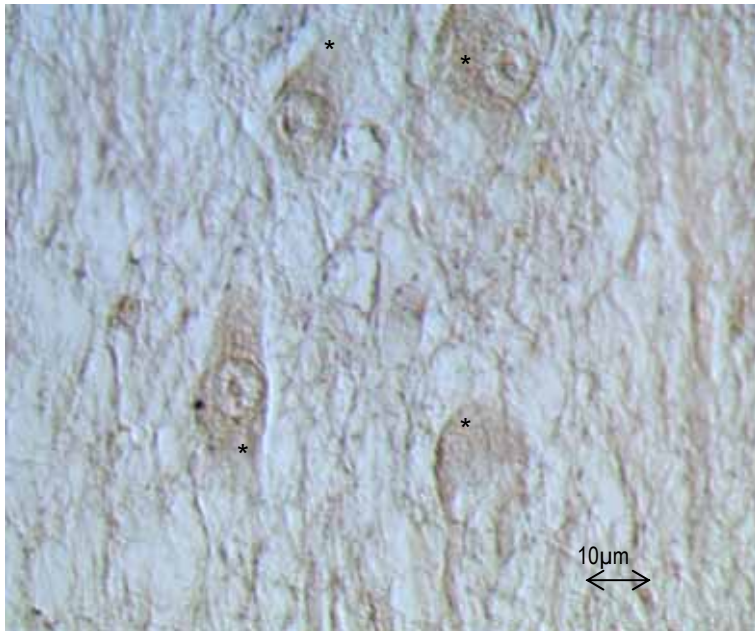


Abb. 13: OTR in magnozellularären Neurone des NPV

100-fache Vergrößerung eines immunhistochemischen Schnittes durch den NSO. Darstellung von OTR in angefärbtem Zytoplasma mehrerer Zellkörper magnozellularer Neurone (*).

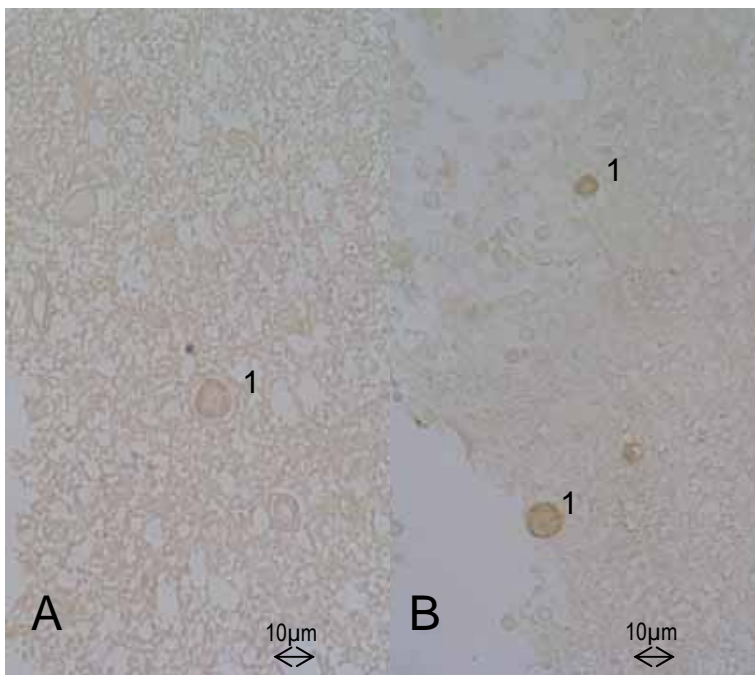


Abb. 14: OTR in axonalen Auftreibungen des NSO

100-fache Vergrößerung von 2 immunhistochemischen Schnitte (A und B) durch den NSO. Darstellung von OTR in angefärbtem Zytoplasma mehrerer axonalen Auftreibungen magnozellularer Neurone (1). Bei B sieht man eine membranäre Feingranulierung.

5.2. Western Blot

Die durch die Affinitätschromatographie gewonnenen SHBG Eluate wurden in der Gelelektrophorese getrennt und auf der Blotting Membran immobilisiert. Anhand von der Firma mitgelieferten Vergleichsbanden für bekannte Proteingewichte (bei 15, 25, 35, 50, 75 und 100 kDa), war es möglich, unseren Banden Proteingewichten zuzuordnen.

Eine breite Bande ist bei 50kDa zu sehen, zusätzlich sind bei 37kDa und 23kDa dünnere Banden sichtbar. Bei 18kDa ist in den Eluaten der 2. und 4. Laufstrecke ein leichter Streifen vorhanden (Abb. 15).

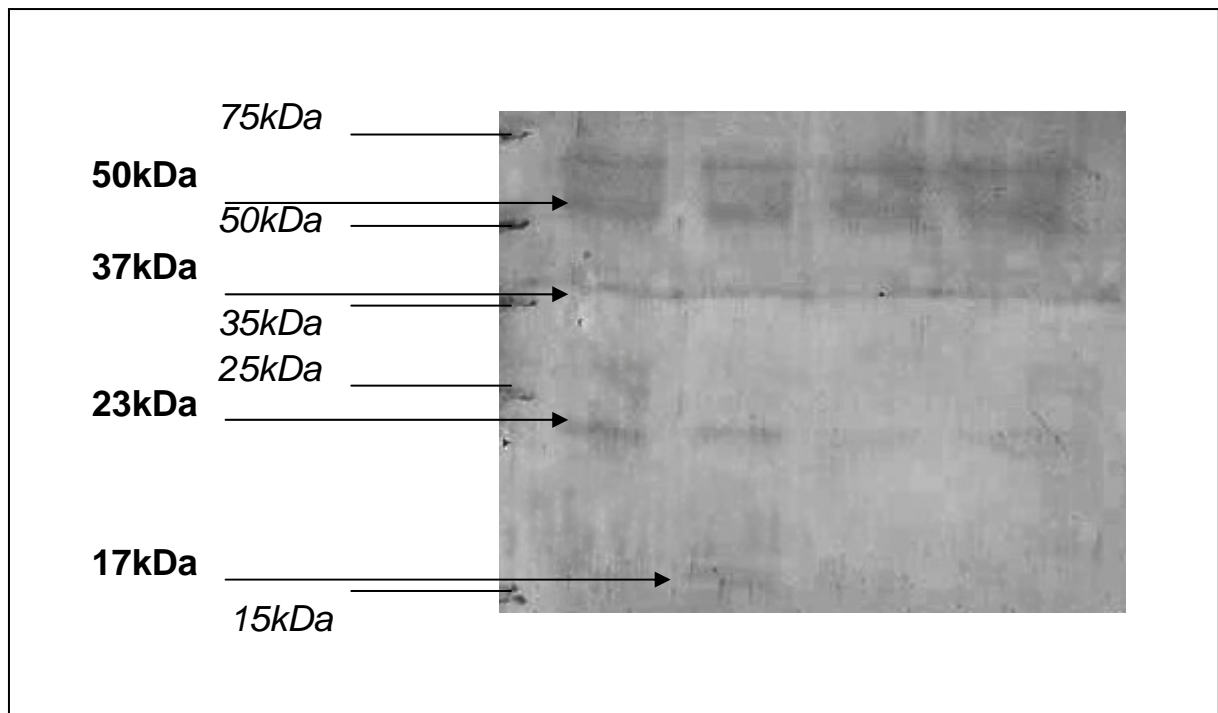


Abb. 15: Western Blot der SHBG Eluate

Die Protein Markerbanden sind mit Strichen angegeben, die Pfeile zeigen auf die sichtbaren Banden bei 17, 23, 37 und 50kDa.

5.3. Kolokalisation von NP, OTR und SHBG

Bei der immunhistochemischen Färbung aufeinander folgender Schnitte von jeweils 1µm Dicke werden die gleichen magnozellulären Neuronen (Durchmesser: 20µm) und die selben axonalen Auftreibungen angeschnitten. Zwei oder drei aufeinander folgende Schnitte werden entweder mit anti-SHBG (1:1) anti-OTR (1:200), oder anti-NP (1:1000) immunhistochemisch gefärbt, um SHBG, OTR oder NP simultan darzustellen. Diese Auswertungstechnik haben wir bei Schnitten benutzt, die dem NSO, dem NPV und dem Infundibulum verschiedener schizophrener Patienten sowie gesunder Kontrollen entstammen, um die Kolokalisation von den obigen Neuropeptiden zu vergleichen und um weiterhin einen Vergleich zwischen Schizophrenen und Gesunden fortzuführen. Die gefärbten Schnitte wurden im Mikroskop verglichen und durch Zählen ausgewertet.

Kolokalisation von NP, OTR und SHBG Kolokalisation wurde sowohl in axonalen Auftreibungen des Infundibulums und in Axone des NSO und NPV observiert (Abb. 16 und Abb. 17).

Manche magnozelluläre Neurone des NPV zeigen ebenfalls eine Immunmarkierung für alle 3 Antigene (Abb. 19). Im NSO wurden Zellen mit allen 3 Immunfärbungen selten gesehen. Eine Kolokalisation in parvozellulären Neuronen gab es nur für NP und OTR. Im Infundibulum war dafür die Kolokalisation von SHBG und NP sehr ausgeprägt bei fast vollständigem Fehlen von OTR (Abb. 18).

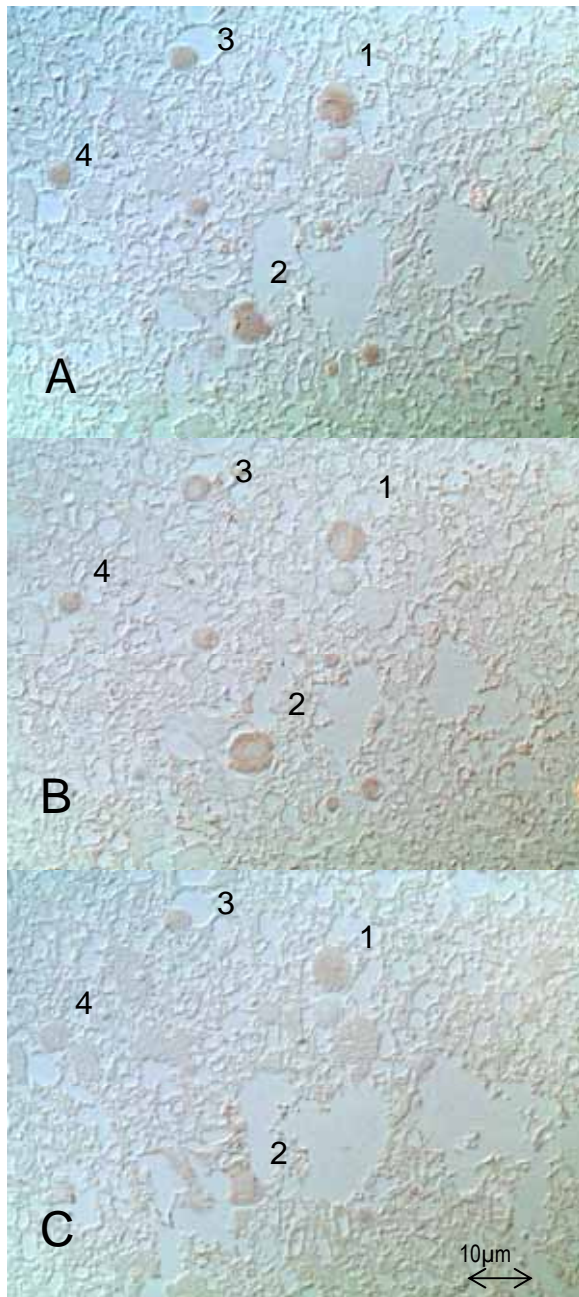


Abb. 16: Antigenkolokalisation im NSO 1
40-fache Vergrößerung von 3 konsekutiven Schnitten immunhistochemisch gefärbt. Es sind Faktoren in axonalen Auftreibungen dargestellt: in A: Neurophysin, B: OTR, C: SHBG. Die Zellen 1, 2 und 3 enthalten NP (1:1000), OTR (1:200) und SHBG (1:1). Zelle 4 enthält nur NP und OTR.

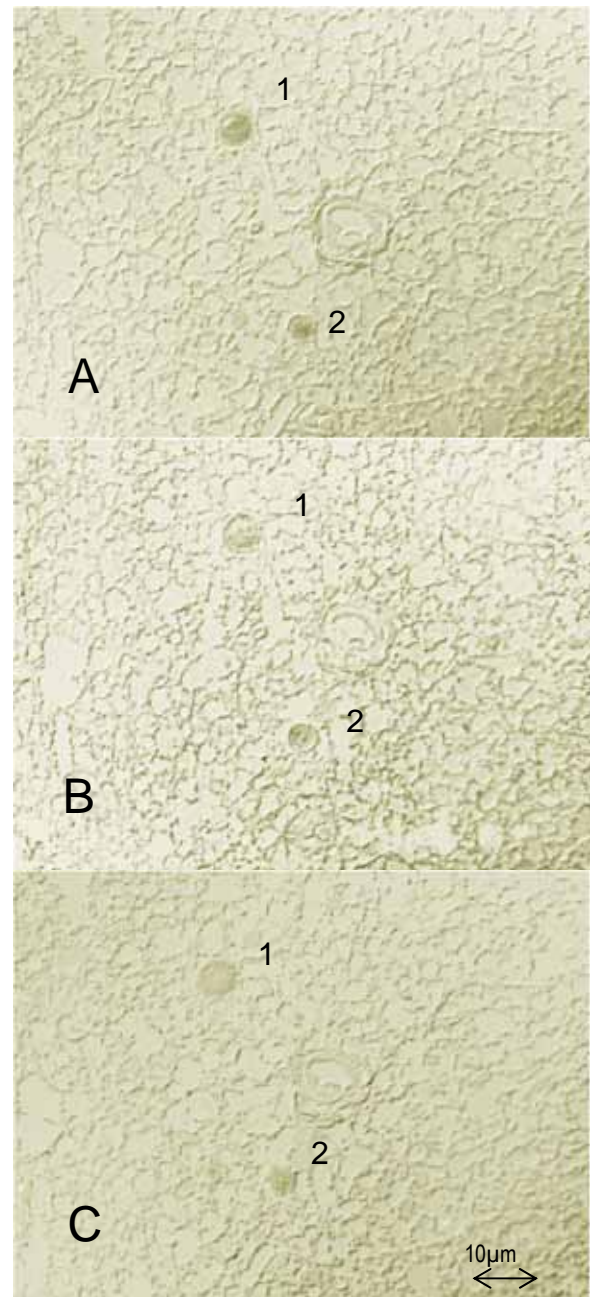


Abb. 17: Antigenkolokalisation im NSO 2
40-fache Vergrößerung von 3 konsekutiven Schnitten immunhistochemisch gefärbt. Es sind verschiedene Faktoren in axonalen Auftreibungen dargestellt: in A: NP (1:1000), B: OTR (1:200) und C: SHBG (1:1). Die Zellen 1 und 2 enthalten NP, OTR und SHBG.

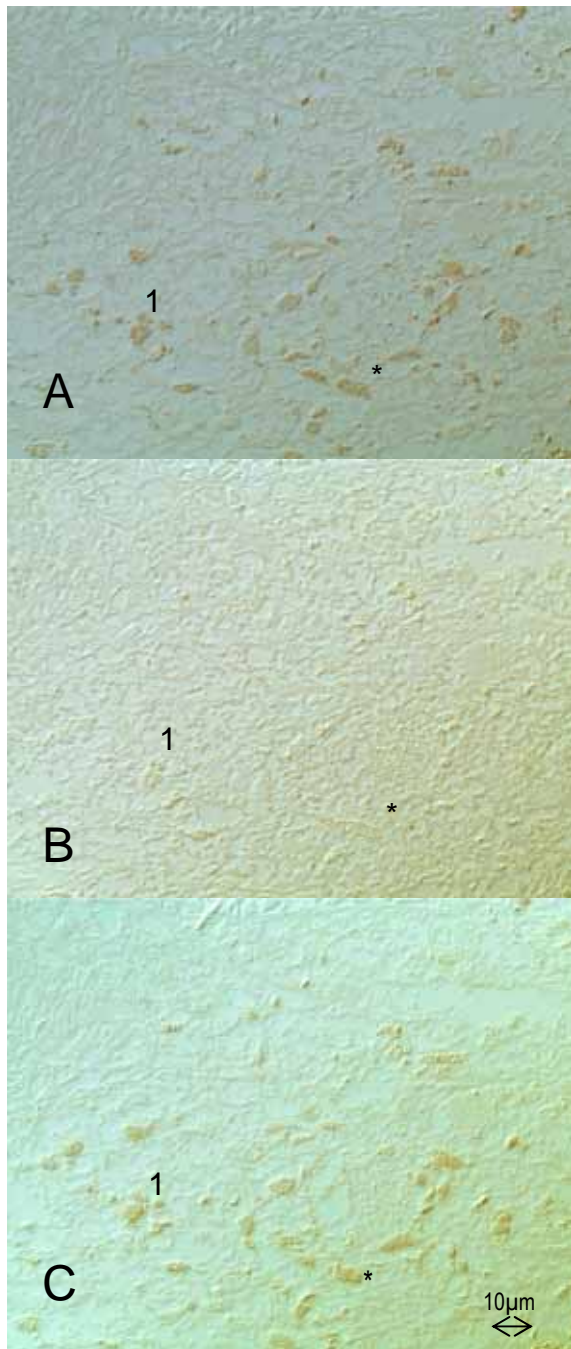


Abb. 18: Antigenkolokalisation im Infundibulum

40-fache Vergrößerung von 3 konsekutiven Schnitten, immunhistochemisch gefärbt. Die Proteine in Zellfasern und Axone sind dargestellt: in A: NP (1:1000), B: OTR (1:200) und C: SHBG (1:1). Die durch (*) markierten Fasern enthalten NP und SHBG, aber kein OTR.

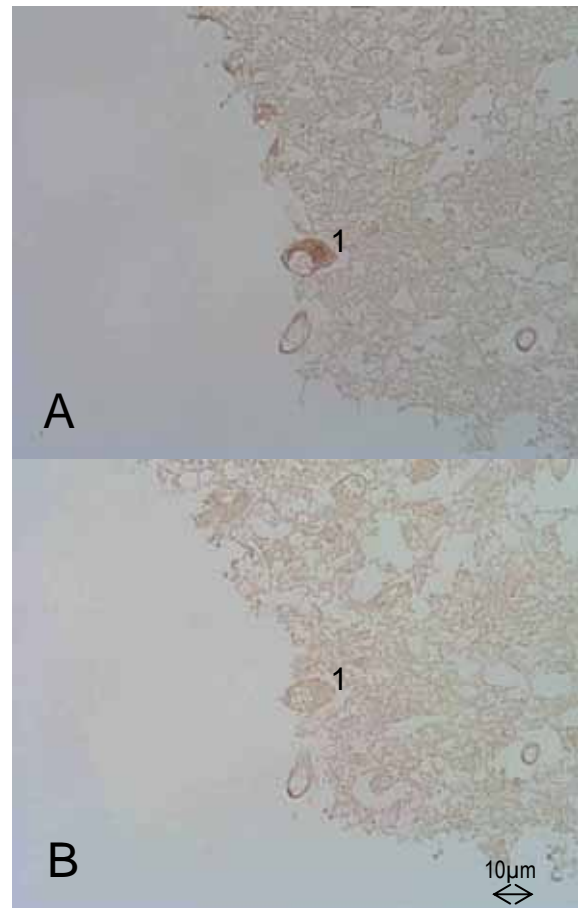


Abb. 19: Antigenkolokalisation im NPV
40-fache Vergrößerung von 2 konsekutiven Schnitten immunhistochemisch gefärbt. Die Proteine in magnozellulären Zellen sind dargestellt: in A: NP (1:1000), und B: SHBG (1:1). Die Zelle 1 enthält NP und SHBG.

Die numerische Auswertung erfolgte bei 6 verschiedenen NPV Schnitten (4 schizophrene Patienten und 2 Kontrollen) und bei 5 verschiedenen NSO Schnitten (2 Schizophrene und 3 Kontrollen). Die Zellen wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. Die parvozellulären Zellen wurden nicht bewertet, sondern nur die Perykaria magnozellularer Neurone. Die nicht gefärbten Zellen wurden anhand ihres Zellkerns, durch ihre typische runde Morphologie, erkannt. Da NP I Teil des Prohormones von OT ist, wird angenommen, dass die durch NP immunhistochemisch markierten Zellen, OT enthalten.

Es ergeben sich bei dieser Untersuchung folgende Mittelwerte für SHBG, OT und OTR enthaltende Zellenanzahl im NSO und NPV (Abb. 20, 21 und 22).

	OTR	SHBG	OT	Anzahl Zellen/ Gesichtsfeld
K NPV		21,5%	22%	25,5
S NPV	13%	16%	21%	27,5
K NSO	20,5%	29%	22%	25,3
S NSO	18%	6,5%	12,5%	30,5

Abb. 20: Mittelwerte für SHBG, OT und OTR enthaltende Zellanzahl im NSO und NPV

K=Kontrollgruppe S=Schizophrene Gruppe

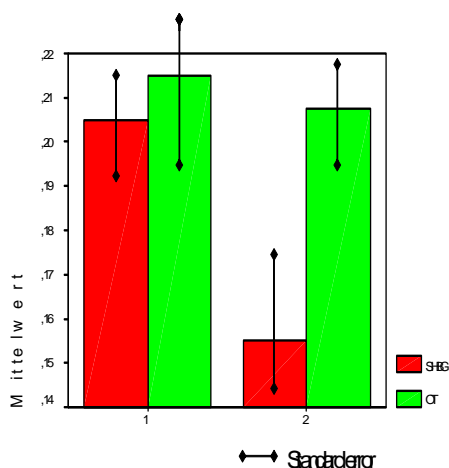


Abb. 21: Anteil der Immunreaktiven Zellen im NPV bei Schizophrenen und Gesunden

1: Kontrollgruppe n=2

2: Schizophrene Gruppe n=4

Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentzahl der markierten Zellen bei 40x Vergrößerung.

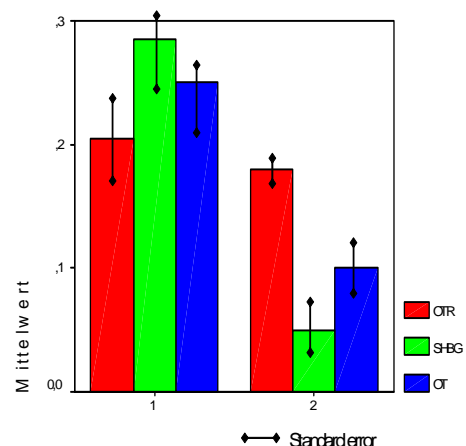


Abb. 22: Anteil der Immunreaktiven Zellen im NSO bei Schizophrenen und Gesunden

1: Kontrollgruppe n=2

2: Schizophrene Gruppe n=4

Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentzahl der markierten Zellen bei 40x Vergrößerung.

Bei einer 40-fachen Vergrößerung des Schnittes sind im Gesichtsfeld ca. 25-30 Zellen vorhanden. Es gibt keinen wesentlichen Unterschied in der Zellzahl zwischen NSO und NPV. Im NPV liegt der Mittelwert bei 26,5 Zellen pro Gesichtsfeld und im NSO 27,9 Zellen pro Gesichtsfeld.

Die Schwankungen der positiven Zellen in den verschiedenen Kerngebieten sind etwas größer, jedoch von geringer Bedeutung, weil die Streuung innerhalb der Gruppen zu groß und die statistische Signifikanz daher gering ist. Die Unterschiede zwischen Kerngebieten der Schizophrenen und Gesunden wurden dem Wilcoxon-W-Test unterzogen und die Signifikanz p ausgerechnet. Der Unterschied ist signifikant wenn $p \leq 0,05$.

Die Mittelwerte für OTR enthaltende Zellen im NSO liegen bei 18% in der schizophrenen Gruppe und 20,5% in der Kontrollgruppe. Im NPV sind in der schizophrenen Gruppe ca. 17% der Zellen angefärbt. Es besteht hier kein wesentlicher Unterschied zwischen Schizophrenen und Gesunden (NSO: $p=1,0$). Die Werte streuen innerhalb der verschiedener Kerngebiete zwischen 12% und 29%.

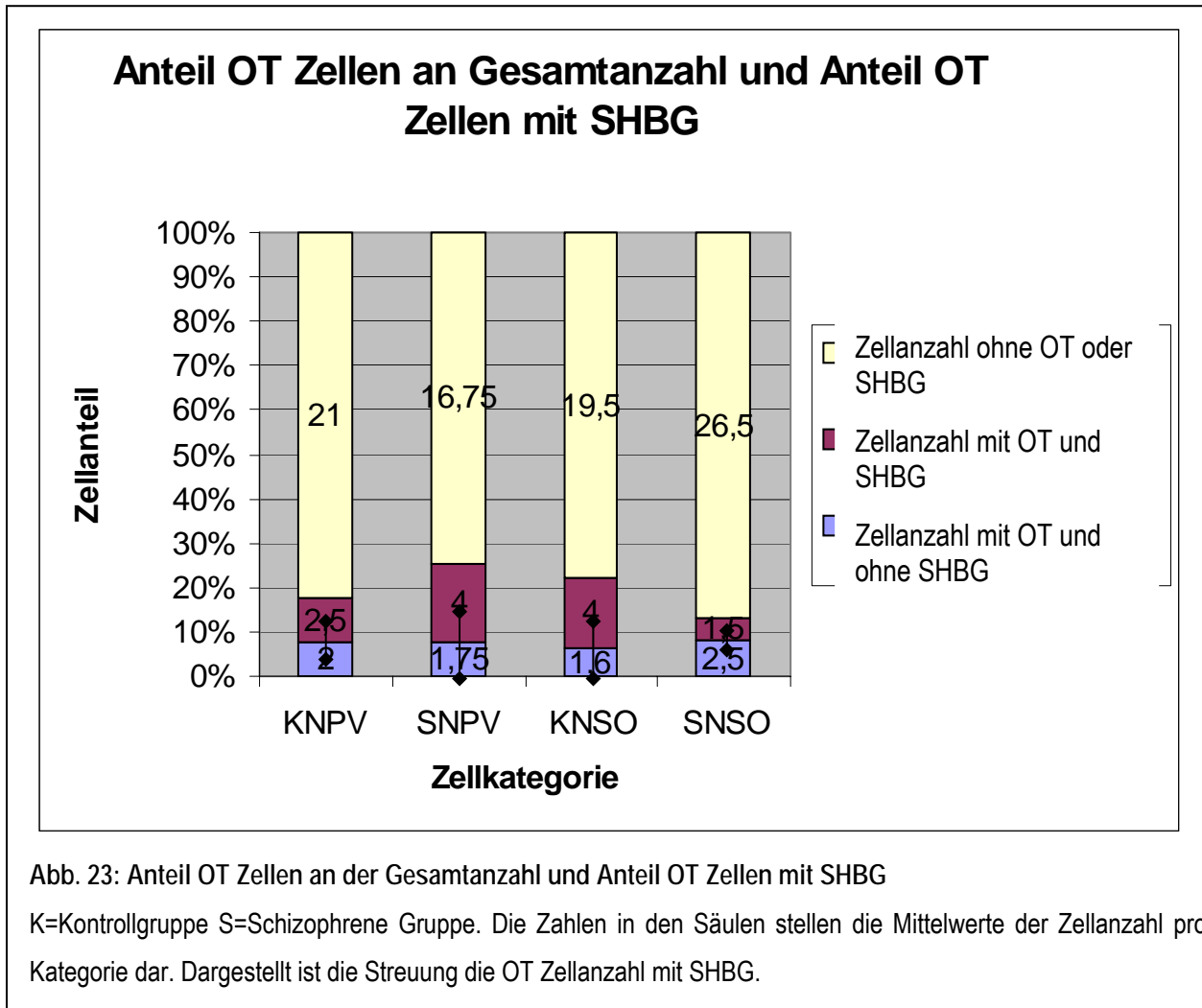
Die Mittelwerte für OT enthaltende Zellen im NSO liegen bei 12,5% in der schizophrenen Gruppe und 22% bei der Kontrollgruppe, im NPV liegen die Werte bei 21% in der schizophrenen Gruppe und 22% bei der Kontrollgruppe. Dabei ist die Streuung innerhalb der Gruppen etwas breiter. Es besteht hier kein wesentlicher Unterschied zwischen Schizophrenen und Gesunden (NPV: $p=0,8$; NSO: $p=0,2$).

Die Mittelwerte für SHBG enthaltende Zellen im NSO liegen bei 6,5% (Schizophrene Gruppe) und 29% (Kontrollgruppe), im NPV liegen die Mittelwerte bei 16% (Schizophrene Gruppe) und 21% (Kontrollgruppe). Es besteht auch hier kein wesentlicher Unterschied zwischen Schizophrenen und Gesunden (NPV: $p=1,0$; NSO: $p=0,2$). Dies ist ebenfalls auf die große Streuung innerhalb der Proben zurückzuführen.

Wegen der niedrigen Anzahl dieser Proben und der relativ großen Streuung können wir hiermit keine Aussage über die Unterschiede der Anzahl der Zellen im Hypothalamus mit Immunreaktivität für OT, SHBG und OTR treffen, kleinere Abweichungen der Antigenkonzentration zwischen den Kranken und Gesunden mit größerer Probenzahl waren nicht signifikant. Jedoch können wir festlegen, dass sowohl beim Schizophrenen wie bei dem Gesunden die oben genannten Antigene vorhanden sind, und dass sie ungefähr 15-25% der gesamten Zellen der untersuchten Kerngebiete ausmachen (Abb. 21 und 22).

Verhältnis der SHBG enthaltenden Zellen zu den OT enthaltenden Zellen

Beim Vergleich der SHBG markierten Schnitte mit OT markierten Schnitte wurde festgestellt, dass mehrere Zellen sowohl OT als auch SHBG enthalten. Auf OT enthaltende Zellen bezogen haben 58% der OT markierten Zellen im NPV zusätzlich SHBG. Im NSO liegt das Verhältnis bei 64% (Abb. 23).



Der Unterschied zwischen Schizophrenen und Gesunden ist hier ebenfalls nicht signifikant. Die Werte von p beim Wilcoxon-W-Test, der die Schwankungen zwischen Kranken und Gesunden innerhalb der zwei Kerngebiete vergleicht, lagen bei $p=0,200$ für den NSO und $p=0,269$ für den NPV. Schwankungen innerhalb der verschiedenen Kerngebiete sind auch hier auf die kleine Stichprobe zurückzuführen.

Verhältnis der SHBG enthaltenden Zellen zu den OTR enthaltenden Zellen

Vergleich zwischen den OTR und den SHBG markierten Schnitten zeigen uns auch in diesem Falle, dass beide Proteine in einer Zelle zu finden sind. Das Verhältnis der SHBG und gleichzeitig OTR enthaltenden Zellen zu den gesamten OTR enthaltenden Zellen liegt bei 52% im NPV und 62% im NSO.

5.4. Vergleich von OT und OTR Immunreaktivität bei Schizophrenen und Kontrollen

Mit anti-NP und anti-OTR immunhistochemisch gefärbte Schnitte von 6 schizophrenen Patienten und 7 gesunden Kontrollen wurden verglichen. Dazu wurde der Anteil der gefärbter Zellen pro Schnitt gezählt. Da die Stichproben klein sind und die Werte nicht einer Normalverteilung folgen, wurden Unterschiede der statistischen Werte zwischen Schizophrenen und Kontrollen dem für unabhängige Variablen geeigneten Wilcoxon-W-Test unterzogen, um deren exakte Signifikanz auszurechnen. In dieser Versuchsreihe gehen wir davon aus, dass eine NP I gefärbte Zelle OT enthält. Der Unterschied gilt als signifikant wenn $p \leq 0,05$.

Im NPV wurde beim Schizophrenen eine Erniedrigung der Zahl der OTR enthaltenden Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt. Der mittlere Rang bei den Schizophrenen betrug 3,40 und bei den Kontrollen 7,60, bei einer exakten Signifikanz von $p=0,032$. (Abb. 24)

Im NPV wurde zusätzlich beim Schizophrenen eine Erhöhung der OT enthaltenden Zellen im Vergleich zum Gesunden observiert. Der mittlere Rang bei den Schizophrenen betrug 9,8 und bei den Kontrollen 4,14, bei einer exakten Signifikanz von $p=0,005$. (Abb. 24)

Im NSO, sowie beim NPV, konnte ebenfalls eine Erniedrigung der OTR enthaltenden Zellen dokumentiert werden. Der mittlere Rang bei den Schizophrenen betrug 3,50 und bei den Kontrollen 9,00 bei einer Signifikanz von $p=0,004$. (Abb. 25)

Dafür gab es keinen signifikanten Unterschied beim Anteil OT enthaltender Zellen im NSO zwischen Schizophrenen und Gesunden. Der mittlere Rang bei den Schizophrenen betrug 5,00 und bei den Kontrollen 6,83 bei einer Signifikanz von $p=0,429$. (Abb. 25)

In beiden Nuklei wurde beim Schizophrenen eine deutliche Verminderung der OTR positiven Zellen festgestellt, bei einer Erhöhung der OT markierten Neurone im NPV, aber nicht im NSO.

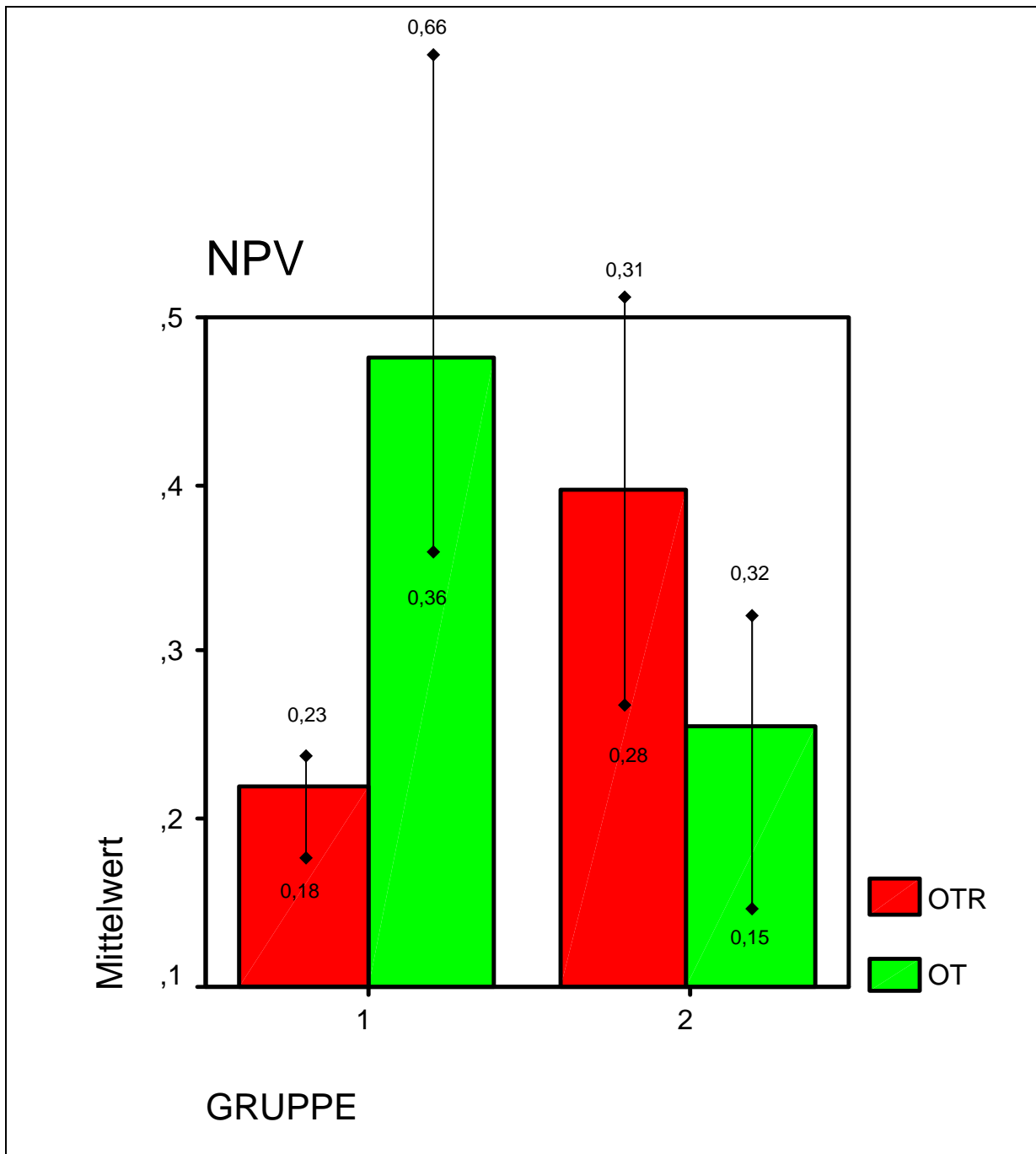


Abb. 24: NPV: Unterschiede der Anteile der OTR und OT markierten Zellen beim Schizophrenen und beim Gesunden

1: Schizophrene Gruppe n=6
2: Kontrollgruppe n=7

Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentzahl der markierten Zellen pro Patient.

Der mittlere Rang für den Anteil der OTR markierten Zellen bei den Schizophrenen betrug 3,40 und bei den Kontrollen 7,60, bei einer exakten Signifikanz von $p=0,032$.

Der mittlere Rang für den Anteil der OT markierten Zellen bei den Schizophrenen betrug 9,8 und bei den Kontrollen 4,14, bei einer exakten Signifikanz von $p=0,005$.

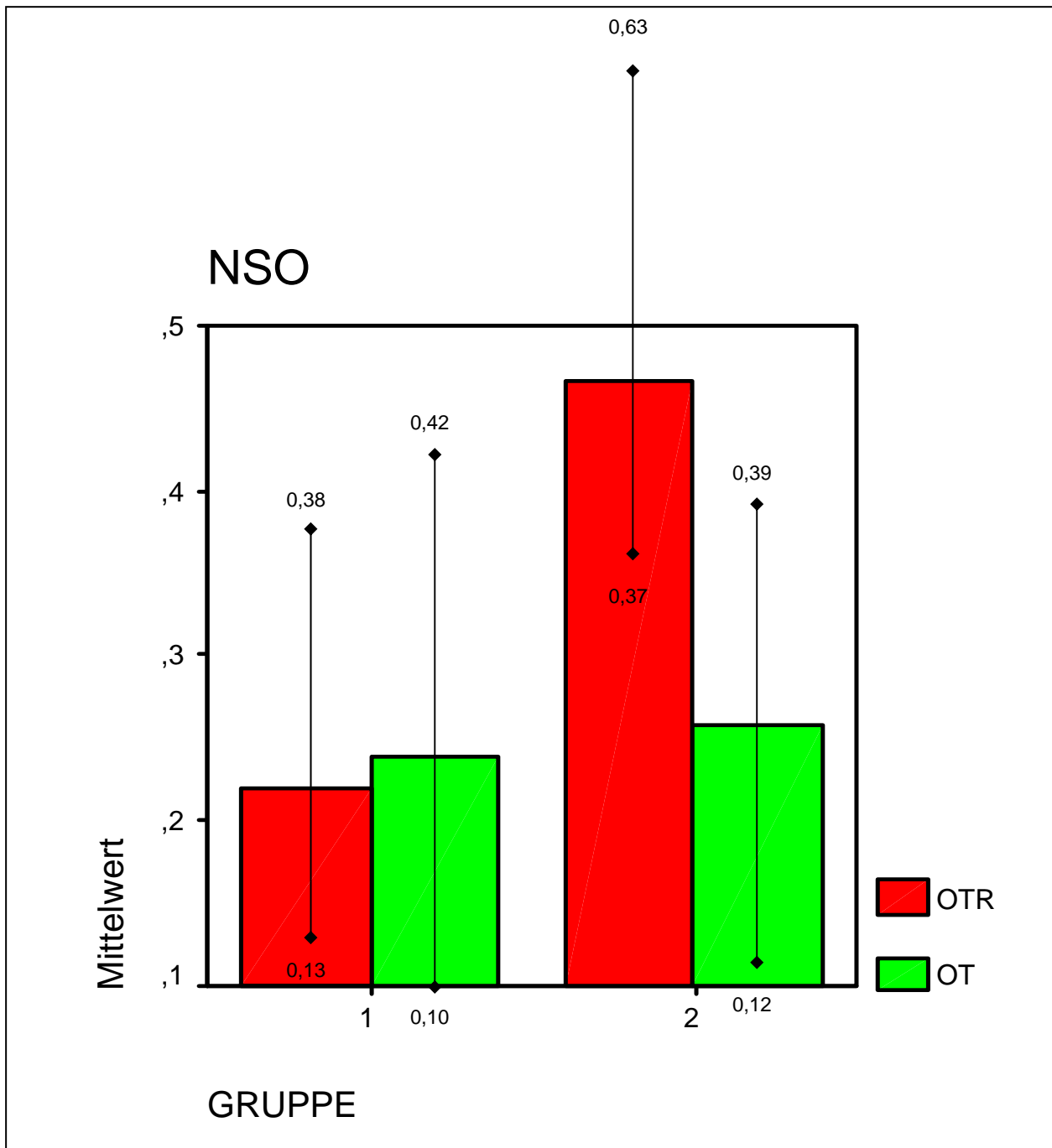


Abb. 25: NSO: Unterschiede der Anteile der OTR und OT markierten Zellen beim Schizophrenen und beim Gesunden.

1: Schizophrene Gruppe n=6
2: Kontrollgruppe n=7

Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentzahl der markierten Zellen pro Patient.

Der mittlere Rang für den Anteil der OTR markierten Zellen bei den Schizophrenen betrug 3,50 und bei den Kontrollen 9,00 bei einer Signifikanz von $p = 0,004$.

Der mittlere Rang für den Anteil der OT markierten Zellen bei den Schizophrenen betrug 5,00 und bei den Kontrollen 6,83 bei einer Signifikanz von $p = 0,429$.

6. Diskussion

6.1. Histochemische Untersuchungen an menschlichem post mortem Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden histochemische Untersuchungen am menschlichen Hypothalamus durchgeführt. Koexistenzstudien von Neuropeptiden und Steroid-Bindungsglobulinen an Kunstharz-eingebetteten Material sind bisher nur am tierischen Gewebe durchgeführt worden. Es ist extrem schwierig gut dokumentiertes und gut fixiertes Gehirngewebe des Menschen zu erhalten, da die post mortem Zeit in der Regel länger als 48h ist und in dem Zeitraum bereits eine erhebliche Autolyse erfolgt.

Diese Arbeit wurde im Rahmen einer europäischen Studie durchgeführt. Die Zustimmung der Ethikkommission lag vor. Allerdings war die Anzahl der Gehirne schizophrener Patienten und der Kontrollen, die für die Studie zur Verfügung standen, sehr niedrig. Die post mortem Zeit zur Sektion und Fixierung des Gewebes schwankte zwischen 1h45 und 71h30. Autolytische Prozesse im ZNS beginnen jedoch schon nach wenigen Minuten. Dies bedeutet, dass viel Material in sehr schlechtem Zustand war und nicht bewertet werden konnte. Es wurden deshalb sehr viele Schnitte gefärbt, um genügend Material für die Auswertung zu erhalten. Die immunhistochemische Färbung der Schnitte wurde mit gut charakterisierten Antikörpern und etablierten Methoden durchgeführt. Aufgrund der Befunde der immunzytochemischen Kontrollen ist davon auszugehen, dass die Färbungen spezifisch waren.

Die hypothalamischen Kerngebiete NPV und NSO wurden mikrodissiziert, entwässert, in Kunstharz eingebettet und dann geschnitten. Die Anatomie des menschlichen Gehirns ist sehr variabel, so dass die Kerngebiete von Patient zu Patient unterschiedliche Ausdehnungen haben können. Dies wurde bei der Auswertung berücksichtigt: Schnitte, die an der Grenze eines Nukleus entnommen worden sind enthalten weniger Zellen als andere, die dem Zentrum des Nukleus entstammen. Auf einem Präparat kann demzufolge die Fläche der dargestellten Nuklei von 0 bis 50% schwanken. Diese Unterschiede wurden beim Auszählen der Präparate berücksichtigt, es wurden die Gesichtsfelder ausgewertet, die die größtmögliche Fläche des Nukleus aufzeigten. Zusätzlich wurden nicht nur die markierten Zellen ausgezählt, sondern auch die nicht markierten Zellen, was eine Prozentzahl statt einer absoluten Zahl ergab, um die anatomischen Schwankungen auszugleichen. Wegen der kleinen Stichproben und der größeren interindividuellen Schwankungen und des Fehlens eines „normalen“ Referenzwertes für die

Anzahl antigenmarkierte Zellen erfolgte der Vergleich mittels des Wilcoxon Tests zur Bestimmung der Signifikanz.

Die Entscheidung das Gewebe in Eponharz einzubetten, wurde aus zwei wichtigen Gründen getroffen. Erstens bietet diese Konservierungstechnik von den vielen Möglichkeiten die beste Erhaltung der histologischen Strukturen und der Antigene (Jirikowski et al., 1990). Zweitens ermöglicht sie das Anfertigen von Schnitten, die 1µm dick sind. Da die angeschnittenen magnozellulären Neurone ca. 25µm groß sind, können Serienschnitte durch einzelne Zellen gelegt werden. Hiermit konnten zwei und drei aufeinander folgende Schnitte für zwei verschiedene Hormone markiert und zellengenau verglichen werden, ohne dass es wie bei Doppelmarkierungen auf einem Präparat, zu Kreuzreaktionen zwischen den Sekundärantikörpern der verschiedenen Färbungen kommt. Doppelmarkierungen für SHBG und OT bei Eponfolgeschnitten wurde von Herbert et al. (2003) im Rattenhypothalamus erfolgreich angewendet. Beim Menschenhypothalamus wurde diese Doppelmarkierung bisher noch nicht durchgeführt.

6.2. Oxytocin im gesunden und im schizophrenen menschlichen Hypothalamus

Oxytocin beeinflusst Sexualverhalten, Stressantwort, Sozialverhalten und Lernprozesse (Kenell et al., 1974; Insel, 1992; McCarthy et al., 1994; Henry und Wang, 1998; Uvnas, 1998). Oxytocinerge Systeme sind bei Schizophrenen verändert und es wird vermutet, dass OT bei der Entstehung der Schizophrenie eine Rolle spielt. In einer 1983 durchgeführten Studie wurde eine leicht erhöhte OT Konzentration im Liquor cerebrospinalis schizophrener Patienten im Vergleich zu Kontrollen beschrieben (Beckman et al., 1985). Das OT assoziierte Neurophysin I im Plasma von Patienten wurde von Legros et al. (1992) sogar als das Dreifache der Norm gemessen. Durch Radioimmunassays für Markierungen mit Neurophysin I, zeigten im NPV des Hypothalamus von Schizophrenen stark verminderte Werte im Vergleich zu den Kontrollen (Mai et al., 1993). Diese Ergebnisse wurden von Glovinsky et al. (1994) bestritten, da sie im Liquor keine signifikante OT Erhöhung maßen. Der Ursprung von OT im Liquor cerebrospinalis ist unklar. Neuropeptidgehalte im Liquor entsprechen nicht notwendigerweise den Gehalten im Hypothalamus.

Wir haben durch Immunhistochemie für Neurophysin I ebenfalls große Unterschiede der NP, bzw. OT enthaltenden Zellen im NSO und NPV des Hypothalamus zwischen Schizophrenen und Gesunden beobachtet. Bei den Schizophrenen war der Anteil der NP I immunmarkierten Zellen signifikant größer als beim Gesunden. Diese Unterschiede waren im NSO nicht so hoch, was auf die kleine Zahl der Patienten,

mit entsprechend großen Schwankungen innerhalb der Probe, zurückzuführen sein könnte. Es ist nicht auszuschließen, dass die Erhöhung des OT Gehalts im NPV beim Schizophrenen auch nukleusspezifisch sein kann. Mai et al. (1993) haben auch eine NP Erhöhung im NPV festgestellt, dafür war im Liquor der Unterschied nicht signifikant (Glovinsky et al., 1994). Weiterhin wurde die bekannte Aktivität der NO-Synthase in oxytocinergen Neuronen im NPV beim Schizophrenen analysiert. Eine verminderte Produktion von NO-Synthase in CRH bildenden parvozellulären Neuronen und in OT und VP produzierenden Neuronen des schizophrenen Hypothalamus (Bernstein et al., 1998), könnte einen regulierenden Einfluss auf die Produktion dieser Hormone beim Schizophrenen haben. Im NSO wurde dafür kein Zusammenhang zwischen NO-Synthase und dem Krankheitsstatus beobachtet (Bernstein et al., 2000). Diese verschiedenen Ergebnisse deuten auf einen erhöhten OT Gehalt des NPV beim Schizophrenen hin.

6.3. SHBG im menschlichen Hypothalamus

Vier monoklonale SHBG Antikörper wurden durch Lewis et al. 1999 hergestellt und charakterisiert. Zwei davon eigneten sich für ELISA Untersuchungen (enzyme linked immunosorbent assay) des humanen Plasma SHBGs. Die Spezifität und Affinität dieser Antikörper entspricht polyklonalen Anti-SHBG Antikörpern. Die Immunmarkierung ist unabhängig ob SHBG Steroide gebunden haben oder nicht. monoklonale Antikörper sind in der Regel wesentlich spezifischer als polyklonale, Kreuzreaktionen sind weniger wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Antikörper von Lewis et al. erstmalig für Immunzytochemie verwendet, ursprünglich waren sie für Affinitätschromatographie und Immunoassays entwickelt worden. In den Kontrollexperimenten konnte sichergestellt werden, dass in den verwendeten Semidünnschnitten gefärbt wurde, die Antikörperkonzentrationen und die Puffersysteme wurden dafür entsprechend modifiziert.

Mehrere Verdünnungsreihen wurden mit den 4 Antikörper durchgeführt, jeweils immer mit einer negativen Kontrolle (Proben, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden). Das Auftauchen einer Markierung bei Verwendung des spezifischen Antikörpers und nicht bei der jeweiligen negativen Kontrolle spricht für eine spezifische Antikörper-Antigen Bindung.

Es wurden bei 150 Schnitten immunhistochemische SHBG Markierungsarbeiten durchgeführt und es zeigte sich eine charakteristische zytoplasmatische Färbung der magnozellulären Zellkörper so wie eine Färbung axonaler Varikositäten. Diese war entweder leicht granuliert oder homogen. Im Infundibulum wurden die Axone des neurohypophysären Traktes gefärbt. Ansonsten wurden keine anderen Zellen, Fasern oder Bindegewebe markiert. Die Hintergrundfärbung ist beim Semidünnschnitt naturgemäß sehr

gering. Die wiederholte Darstellung derselben immungefärbten Strukturen in Folgeschnitten spricht gegen eine Kreuzreaktion oder unspezifische Färbung.

SHBG ist ein Glycoprotein welches Sexualhormone spezifisch bindet und transportiert (Avvakumov et al., 2001). Die Genexpression von SHBG ist bei der Maus in Organen erhöht wo höhere Konzentrationen von Steroiden gebraucht werden (Ovarien, Hoden, Gehirn) und erhöht so deren Bioverfügbarkeit (Joseph, Power, Petrusz, 1997). Wir haben das Vorkommen dieses Proteins in magnozellulären Neuronen des NPV und NSO des menschlichen Hypothalamus erstmalig immunhistochemisch nachgewiesen. Diese Kerngebiete sind die Bildungsorte von OT. Es ist bekannt, dass das Gen von OT mehrere Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren hat. Davon sind an dieser Stelle die Östrogenrezeptoren nennenswert (Burbach et al., 1994). Die OT Expression ist östrogenabhängig. Weiterhin zeigen Tierversuche, dass höhere Steroidspiegel eng mit Verhaltensweisen, die OT abhängig sind, korreliert sind. Es wurde bereits erwähnt, dass das limbische System mit dem Hypothalamus für die Koordination dieser Verhaltensmuster wichtig ist.

Das Vorhandensein von SHBG im menschlichen Hypothalamus deutet darauf hin, dass hier ein intrinsisches Steroidtransportsystem existiert. Die Rolle dieses transportierenden Globulins im Hypothalamus könnte die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Östradiol, Testosteron und DHT für die Zielzelle sein. Da Steroide eng mit der OT Genexpression verknüpft sind, scheint SHBG auch bei der oxytocinergen Genregulation eine Rolle zu spielen. Die Tatsache, dass die meisten SHBG enthaltenden Zellen selber OT produzieren, deutet auf gemeinsame Transportfaktoren hin. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Ratten gemacht (Herbert et al., 2003).

Noch besteht die Frage, ob SHBG in neuroendokrinen Zellen des menschlichen Hypothalamus produziert wird. Das kann durch Immunzytochemie alleine nicht geklärt werden. Bis jetzt wurde nur im NSO und NPV der Ratte mit in situ Hybridisierung SHBG kodierende mRNA nachgewiesen (Herbert et al., 2002). In situ Hybridisierung am menschlichen Gehirngewebe ist aufgrund der relativ langen post mortem Zeit und der unzureichenden Fixierung unmöglich. Dass SHBG ins Gehirn über die Blutbahn transportiert wird, ist allerdings wenig wahrscheinlich, denn SHBG ist ein homodimeres Protein (Griffin et al., 1989) mit einem Molekulargewicht von 47kDa (Joseph et al., 1987), welches ohne Hilfs- und Transport-mechanismen die Blut-Hirn-Schranke durch Diffusion allein nicht passieren könnte.

SHBG wurde im menschlichen Hypothalamus auch durch biochemische Verfahren nachgewiesen. Hypothalamisches SHBG wurde mit Affinitätschromatographie aus Gewebehomogenaten isoliert. Mit den

monoklonalen SHBG Antikörpern wurden im Western Blot markierte Banden beobachtet, die den bekannten Untereinheiten von menschlichen SHBG-Sequenzen entsprechen.

Deutliche Banden bei 50kDa entsprechen der Masse des Monomers: Western Blot Analysen stellten die 48kDa „major band“ und die 46kDa „minor band“ des humanem Plasma SHBG dar. Mit Massenspektrometrie wurde für das Monomer im Testis des Menschen ein Molekulargewicht von 47kDa festgestellt (Joseph et al., 1994). Später wurde das humane deglycosylierte Wildtyp Molekül charakterisiert (Sui et al., 1999) und eine Masse von 39,7178kDa bestimmt. Die in dieser Arbeit beobachtete Bande bei 37kDa könnte dem nicht glycosilierten Monomer entsprechen.

Zusätzliches alternatives Exon Splicing wurde in mehreren Geweben verschiedener Spezies beschrieben (Hammond and Bochinfuso, 1996; Joseph, 1994; Sullivan et al., 1993) und führt zur Synthese von SHBG ähnlichen Proteinen, die keine Steroide binden. Die Banden bei 23 und 17 kDa könnten solche Proteine darstellen. Die Möglichkeit, dass die beobachteten Fragmente Folge von Präparationsartefakten des menschlichen Gewebes sind, lässt sich ausschließen durch die Ähnlichkeit der 3 Massen von 50, 37 und 23 kDa mit denen, die bei der Ratte gefundenen worden sind. Im Rattenhypothalamus wurde SHBG mit Gelelektrophorese aufgetrennt. Banden färbten sich im Western Blot bei 50, 36 und 22 kDa. Dies wurde mit Seldi TOF Massenspektrometrie bestätigt (Herbert et al., 2003). Das biochemisch isolierte Monomer mit 50kDa lässt auf die Existenz eines Proteins rückschließen, welches Steroidhormone bindet.

6.4. OTR im menschlichen Hypothalamus

Oxytocin ist nicht nur ein peripheres Hormon, sondern auch ein zentraler Neurotransmitter (Buijs et al., 1978). OT steuert beim Sexual- und Brutpflegeverhalten (Caldwell et al., 1989), die zentrale Stressantwort (Lang et al., 1981) oder Sozialverhalten (Carter et al., 2000). Auch beim Mensch hat OT sicherlich Neurotransmitterfunktion. Histochemische Untersuchungen zum Nachweis von OTR existieren noch nicht und waren zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit.

Immunhistochemische Nachweise von OTR wurden schon in verschiedenen Geweben verschiedener Spezies durchgeführt. Bei der Ratte wurden OTR in folgenden Regionen nachgewiesen: in manchen Teilen des Neokortex, im Bulbus olfactorius, Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm, Rückenmark, Nukleus olfactorius anterior, Globus pallidum, limbischen System, Stria terminalis, Amygdala und Subiculum ventralis (Tribollet et al., 1992; Barberis et Tribollet, 1996). Ähnliches wurde beim Affen im Hypothalamus beobachtet (Boccia et al., 2001). OTR wurde bisher noch nicht im menschlichen ZNS immunhistochemisch dargestellt. Es mussten mehrere Verdünnungsreihen des Primärantikörpers durchgeführt werden, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Die verwendeten Antikörper wurden

vom Hersteller charakterisiert, Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen wurde ausgeschlossen. Es wurden immer negative Kontrollen, ohne Gabe von Primärantikörper durchgeführt, die nie eine Färbung zeigten. Die Blockierungen der endogenen Peroxidase limitierten die mögliche Oxidation des DAB im Gewebe und wirkte insofern einer Hintergrundfärbung entgegen.

Die Tatsache, dass bestimmte Strukturen in Folgeschnitten wiederholt markiert wurden, ist ein weiterer Hinweis für die Spezifität dieser Färbung. Eine feine zytoplasmatische Färbung wiederholte sich in magnozellulären Neuronen des NPV und des NSO sowie in axonalen Auftreibungen des Infundibulums. Die membranständige Markierung von Nervenendigungen, wurde nur bei immunhistochemischer Färbung für OTR gefunden und entspricht der erwarteten Lokalisation von OTR. Markierungen mit anti-SHBG und anti-NP wurden nur im perinukleären Zytoplasma in Kerngebieten oder in Axonen im Infundibulum dargestellt, welches die Spezifität der Methode weiter beweist.

OTR sind bereits in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen worden: Ovar, Mamma und Endometrium (Ivell, 1987). Es ist anzunehmen, dass OT in diesen Organen bestimmte physiologische Funktionen erfüllt.

Bei der Ratte ist die Expression von OTR im ventromedialen Hypothalamus, Amygdala und anderen Teilen des limbischen Systems bekannt (Tribollet et al., 1992; Barberis et al., 1996). Das limbische System ist mit dem Papez-Neuronenkreis an der Steuerung von verschiedenen Verhaltensweisen, wie zum Beispiel an Sexual- und Brutpflegeverhalten beteiligt.

Weiter ist bekannt, dass die OT Spiegel bei der Ratte bei bestimmten Verhalten erhöht sind und hier eine wichtige Rolle spielen, ohne OT sind manche Verhaltensmuster stark unterdrückt (Sexualtrieb, Brutpflege- und Sozialverhalten), (Pedersen und Prange, 1979; Richard et al., 1991; Carmichael et al., 1987; Murphy et al., 1990; Carter, 1992; Insel, 1992; Pedersen et al., 1992; Nelson und Panksepp, 1998). Das OT hat einen starken Einfluss auf die Informationsverarbeitung im limbischen System. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass OTR auch im menschlichen Hypothalamus vorhanden sind. Im NPV und NSO besitzen viele magnozelluläre Neurone OTR Immunreaktivität. Im Infundibulum und in der Eminentia mediana sind Nervenfasern auch OTR positiv.

Das Oxytocinrezeptorprotein beim Menschen könnte im ZNS wie in der Peripherie (Fuchs et al., 1995) die Ansprechbarkeit der Zielzellen auf OT erhöhen und so die Wirkung von OT im Hypothalamus und limbischen System ermöglichen.

OTR wird häufig von magnozellulären Neuronen exprimiert, die selber NP I enthalten. Diese Zellen besitzen also das Prohormon von Oxytocin, welches noch die posttranslationale Prozessierung

durchmachen muss bevor das Oxytocin freigesetzt werden kann. Die Neurophysin enthaltenden Zellen im NSO und NPV sind die Bildungszellen für OT.

Der immunhistochemische Nachweis von OTR auf diesen magnozellulären Neuronen weist auf eine autokrine Regulation oxytocinerger Systeme im Hypothalamus hin. Die Expression von OTR in einer OT bildenden Zelle könnte eventuell eine Bedeutung bei der Regulation der OT Produktion haben. Für eine negative Rückkopplung bei zu hohem OT Spiegel könnte eine G-Protein vermittelte Phosphorylierung eines bestimmten Promotors in Frage kommen. Im Infundibulum, dem Hypophysenstiel, zeigen die oxytocinerger Axone viel weniger OTR. Dies könnte eventuell bedeuten, dass sie hier eine nicht so wichtige Rolle spielen, was wiederum dafür spricht, dass im menschlichen Hypothalamus die OTRs am Zellkörper ihre Hauptfunktion besitzen. Dort wo OT produziert wird sind OTR vorhanden, um die Genexpression zu regulieren.

Unsere Studie zeigt, dass OT Rezeptoren im schizophrenen NPV und NSO deutlich erniedrigt sind im Vergleich zu dem gesunden Hypothalamus. Am NPV könnte dies eine Erklärung der erhöhten Stressempfindlichkeit sein, durch vermindertes Ansprechen des OT auf parvozelluläre Neurone und demzufolge eine verminderte Anxiolyse (Bale et al., 2001). Studien in Abschnitten des limbischen Systems, dem Bulbus olfactorius (Schäfer, 2003) zeigen ein umgekehrtes Ergebnis, hier sind die OTR beim schizophrenen Patienten erhöht. Möglicherweise spielen hier unterschiedliche Rezeptordichten eine Rolle.

Diese Verminderung der OTR könnte die Affinität des Nonapeptids an Zielzellen und damit seine Wirkung vermindern. Wir wissen jedoch, dass das OTR Gen Promotorstellen für cAMP hat (Bale und Dorsa, 1997). Weiter ist bekannt, dass dopaminerge D2a-Rezeptoren durch inhibitorisches G-Protein und PKA die Phosphorylierung von cAMP hemmen (Bale et al., 2001). Mehrere Studien belegen, dass das dopaminerge Systeme und vor allem die D2b-Rezeptoren beim Schizophrenen verändert sind (Kandel, 1991). Viele Teile des Gehirnes sind davon betroffen: Amygdala, Bulbus olfactorius, andere Teile des limbischen Systems und des präfrontalen Kortexes. Die Erhöhung der OTR Expression im Bulbus könnte deshalb auch auf die Störung des dopaminerges Systems und der cAMP vermittelten Genregulation zurückzuführen sein.

Dafür sind im Hypothalamus dopaminerge Systeme weniger ausgeprägt. Die OTR Expression ist vermindert. Tierversuche zeigen, dass die OTR Spiegel in der Peripherie stark steroidabhängig sind, und obwohl Estrogen Responsive Elements am OTR noch nicht nachgewiesen worden sind, könnte hier eine steroidabhängige Expression vorliegen. In diesem Falle wäre beim Schizophrenen die erniedrigte OTR Häufung auf eine Dysfunktion der Steroidhormonregulation zurückzuführen.

6.5. Kolokalisation von OT, SHBG und OTR bei Schizophrenen und Gesunden

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen Koexistenz von OT und OTR in Neuronen des NSO und NPV. Ähnliche Beobachtungen wurden im Hypothalamus der Ratte gemacht (Ivell et al., 1985). „Autorezeptoren“ könnten für eine negative Rückkopplung und Regulierung der Oxytocinsekretion und oxytocinergen Genexpression verantwortlich sein.

Gleichzeitig sind viele SHBG enthaltenden Zellen auch OT bildenden Neuronen. SHBG bringt die Steroide an die Zielzelle (Petrusz et al., 1997). Die Interaktion mit dem als Transkriptionsfaktoren funktionierenden klassischen nukleären Rezeptoren ist bisher noch unklar. Östradiol spielt eventuell auch in der oxytocinergen Genexpression eine Rolle. Sowohl OTR und SHBG sowie die Steroide selbst sind also wahrscheinlich in einem komplexen Regulationsmechanismus integriert.

Die Existenz von SHBG im menschlichen Gehirn lässt dessen eventuelle neuroendokrine Rolle und Einflüsse auf das Verhalten vermuten. Sowohl im Hypothalamus infundiertes OT als auch SHBG rufen bei Tiermodellen eine Erhöhung der sexuellen Rezeptivität hervor (Caldwell et al., 2002). OT Wirkung (Anderson und Dennerstein, 1994) und SHBG Expression (Gao et al., 2003) wird durch Steroidhormone beeinflusst. Beim Mensch ist der Einfluss von OT auf verschiedene Verhalten bekannt und neuere Versuche haben auch den Einfluss von SHBG auf das Verhalten und das Auftreten von psychischen Störungen dargestellt (Daly et al., 2003). Es lässt vermuten, dass ähnlich wie in der Peripherie (Petrusz et al., 1997), durch SHBG im Gehirn die Affinität der, für Sozial- und Sexualverhalten, wichtigen Steroidhormone an der Zielzelle erhöht wird.

Die Kolokalisation des SHBG in oxytocinergen Zellen und der gemeinsame Einfluss von Steroiden und OT auf bestimmte Verhaltensweisen lässt auf mehrere Hypothesen zu.

Es ist möglich, dass beide Proteine zusammen auf ähnliche Weise die zelluläre Antwort im Hypothalamus auslösen, z.B. durch ein gemeinsames Rezeptorsystem, und ihre Wirkung potenzieren. Der zusätzliche Befund, dass sich SHBG und OT außerhalb des Hypothalamus in den gleichen terminalen Axonen des Infundibulums befinden, wo keine Proteinsynthese stattfindet, sondern wo es nur zur Hormonausschüttung kommt, deutet wieder auf eine Zusammenarbeit der Proteine außerhalb der Genregulation hin.

Weiterhin könnten diese Proteine einen gegenseitigen Einfluss auf die respektive Genregulation in magnozellulären Neuronen des NSO und NPV haben. Das OT abhängige Verhalten sowie die OT Pegel

korrelieren sowohl beim Tier (Tribollet et al., 1990) als auch beim Mensch mit der Steroidhormonkonzentration. Ein nukleärer Hormon-Rezeptor-Locus vor dem Exon I enthält eine ERE („estrogen response element“) ähnliche Struktur bei der Ratte und beim Mensch, welche sich durch Estradiol stimulieren lässt (Burbach et al., 1994). Jedoch befinden sich in oxytocinergen magnocellulären Neuronen des Hypothalamus nur wenige nukleäre Estrogen Rezeptoren, die zusammen mit den Estrogenen, in vitro co-transfiziert, die OT Transkription anregen (Peterssen et al., 1999).

Die feingranulierte Färbung auf membranären Strukturen der Zellkörper in unseren immunhistochemischen Markierungen von Semidünnschnitten unterstützt die Hypothese, dass membranäre Bindungsstellen für SHBG im ZNS existieren. Ein SHBG Rezeptor wurde bisher noch nicht identifiziert. 1998 haben Fortunati et al. allerdings mit Zellkulturexperimenten an Brustkrebszelllinien zelluläre SHBG Bindung nachgewiesen.

In vivo Experimente mit weiblichen Ratten zeigen, dass Infusion von SHBG im Hypothalamus deren sexuelle Rezeptivität erhöht. Radioaktivmarkiertes Progesteron an Membranpräparationen des Hypothalamus wird von SHBG verdrängt v.a. nach vorheriger Behandlung mit Östradiol (Caldwell, 2001). Beim Mensch könnte nach ähnlichem Modell SHBG an die Zellmembran binden. Das Vorhandensein eines SHBG Rezeptors ist mehrfach postuliert worden (Ding et al., 1998). Auch im ZNS des Menschen könnte SHBG über einen entsprechenden Rezeptor in die Kontrolle von Reproduktionsverhalten involviert sein (Caldwell et al., 2002).

Bei Schizophrenen Patienten wurde im Vergleich zu der gesunden Kontrolle im Liquor cerebrospinalis eine Erhöhung der OT Spiegel nachgewiesen, im Vergleich zu der gesunden Kontrolle (Beckman et al., 1985). Wir beobachteten anhand von immunhistochemischen Färbungen im NPV, aber nicht vom NSO, von schizophrenen Patienten eine Verstärkungen von OT Immunreaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen. So können wir die Hypothese einer zentralen Überproduktion von OT bestätigen. Jedoch ist unklar, ob dies eher die Folge anderer primären Veränderungen ist. Zur schizophrenen Symptomatik gehören Mangel an Affekt, Probleme der sozialen Interaktion usw., was eher auf einem OT Mangel hinweist (Henry und Wang, 1998). Es ist daher zu vermuten, dass eine veränderte OT Expression mit Veränderungen der Expression von OTR zusammenhängt und dass oxytocinerge Wirkungen durch SHBG beeinflusst werden können. Ein sehr deutlicher Unterschied zwischen Schizophrenen und Kontrollen wurde an der hypothalamischen Lokalisation von OTR beobachtet. Sowohl im NPV als auch im NSO war der Anteil OTR markierter Zellen beim Schizophrenen stark vermindert. Sozialverhalten, Kognition etc. werden durch OT moduliert (Nelson und Panksepp, 1998). Weite Teile des limbischen Systems und des präfrontalen Kortex enthalten OTR. Wahrscheinlich ist die Beziehung

zwischen Rezeptor und Ligand nicht linear, möglicherweise können erhöhte OT Spiegel die Affinität von OTR verändern, ähnlich wie dies für andere Peptidrezeptoren, wie z.B. für den Insulinrezeptor bekannt ist.

Studien haben gezeigt, dass sich Symptomatik der Schizophrenie sich mit körperlichen Schwankungen von Steroiden ändert (Monteleone et al., 1994; Newcomer et al., 1998). Das OT Gen besitzt Estrogen responsive Elemente (EREs), (Burbach et al., 1994). Psychische Veränderungen können mit Veränderungen der östrogenabhängigen OT Expression zusammenhängen: beim postmenopausalen Syndrom leiden Frauen an depressiven Verstimmungen. Bei Tieren gehen Verhaltensänderungen mit einem OT Mangel einher und werden induziert durch sinkende Sexualhormonspiegel. So könnte durch Östrogenmangel eine verminderte OT Expression ausgelöst werden.

Infolgedessen könnten wir folgende Hypothese formulieren, um die Erhöhung von OT Expression im Hypothalamus zu erklären:

Beim Gesunden würden Östrogene die OT Expression regulieren, beim Schizophrenen könnte diese Regulation gestört sein. Ob diese Störung von der Steroidkonzentration abhängt oder ob andere Prozesse hier im Gange sind, wie z.B. die Anzahl nukleärer Steroidrezeptoren, ist unklar. Durch eine Hemmung der Genexpression könnte SHBG beim gesunden Menschen die OT Produktion regulieren. In wieweit ein eigener SHBG Rezeptor hierbei eine Rolle spielt (Ding et al., 1998), ist das Thema weiterer Untersuchungen.

7. Schlussfolgerungen

Diese Arbeit weist zum ersten mal SHBG und OTR auf zellulären Niveau im menschlichen Hypothalamus nach und bestätigt frühere biochemische Befunde. Obwohl der letztendliche Beweis für eine SHBG Expression in hypothalamischen Neuronen nicht erbracht werden kann, da post mortem mRNA im menschlichen Gewebe hybridisierungshistochemisch kaum mehr nachweisbar ist, sprechen die folgenden Befunde dafür: In situ Hybridisierungen von mRNA bei der Ratte zeigte die Lokalisation von SHBG in Hypothalamus-Neuronen, und es ist nahe liegend, dass menschliche Neurone SHBG in ähnlicher Weise produzieren. SHBG wird wahrscheinlich nicht aus dem Blut aufgenommen, da es aufgrund seiner Molekülgröße die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann.

Die Lokalisationen von SHBG im Hypothalamus, Infundibulum und Eminentia mediana legen nahe, dass das Steroid-Bindungsglobulin vielfältige Funktionen in dieser Region haben könnte: Fasern vom Hypothalamus projizieren in das Rückenmark und den Hirnstamm, andere Fasern in das Striatum. Ähnlich wie hypothalamische Neuropeptide könnte SHBG ein zentraler Neurotransmitter sein. Weiterhin ist SHBG im hypothalamo-hypophysiären Trakt vorhanden und im periventrikulären System, in engem Kontakt zum Liquor. Es ist bekannt, dass SHBG im Liquor vorhanden ist. Diese Lokalisationen sind weitgehend übereinstimmend mit der Verteilung des oxytocinergen Systems. Diese multiplen Lokalisationen legen nahe, dass es im Hypothalamus ein intrinsisches Steroid-Bindungssystem gibt, das in multiplen Funktionen involviert ist: als Hypophysenhinterlappenhormon, als zentraler Transmitter und als hypophyseotroper Faktor, als Liquorprotein etc..

Die Kolokalisation mit OT legt eine funktionelle Beziehung zu diesem Peptid nahe. Ähnlich wie es beim Versuchstier dargestellt wurde, könnte SHBG beim Menschen Sexualverhalten, mütterliche Instinkte und Sozialverhalten, aber auch die zentrale Stressantwort steuern. Dadurch könnten sich neue Gesichtspunkte für die Entstehung von Wochenbettpsychosen oder affektive Erkrankungen (z.B. in Zusammenhang mit Menopause-assoziierten Psychosen) ergeben.

Die Verminderung von OTR beim schizophrenen Patient ist ein neuer Befund und könnte mit der bekannten vermehrten Expression von Oxytocin bei dieser Erkrankung korrelieren. Eine therapeutische Verwendung von Oxytocin für die Schizophrenie wird diskutiert.

8. Literaturverzeichnis

Adan RA, Cox JJ, Van Kats JP, Burbach JP. 1992. Thyroid hormone regulates the oxytocin gene. *J Biol Chem*, 267(6):3771-3777.

Amico JA, Davis AM, McCarthy MM. 2000. An ovarian steroid regimen that increases hypothalamic Oxytocin expression alters (3H)-muscimol binding in the hypothalamic supraoptic nucleus of the female rat. *Brain Res*, 857(1-2):279-82.

Anderson HM, Dennerstein L. 1994. Increased female sexual response after oxytocin. *BMJ*, 309:929.

Argiolas A. 1992. Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site, and mechanism of action. *Ann NY Acad Sci*, 652:194-203.

Arletti R and Bertolini A. 1985. Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides*, 6:247-253.

Avvakumov GV, Müller YA, Hammond GL. 2000. Steroid Binding specificity of human sex hormone binding globulin is influenced by occupancy of a zinc-binding site. *J Biol Chem*, 275(34):25920-5.

Avvakumov GV, Grishkovskaya I, Muller YA, Hammond GL. 2001. Resolution of the human sex hormone-binding globulin dimer interface and evidence for two steroid-binding sites per homodimer. *J Biol Chem*, 276(37):34453-7.

Bale TL, Dorsa DM. 1987. Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology*, 138:1151-1158.

Bale TL, Dorsa DM. 1995. Sex differences in the effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the ventromedial hypothalamus. *Endocrinology*, 136:27-36.

Bale TL, Dorsa DM. 1998. NGF, cyclic AMP, and phorbol esters regulate oxytocin receptor gene transmission in SK-N-SH and MCF7 cells. *Mol Brain Res*, 53:130-7.

Bale TL, Pedersen CA, Dorsa DM. 1995a. CNS oxytocin receptor mRNA expression and regulation by gonadal steroids. *Adv Exp Med Biol*, 395:269-80.

Bale TL, Dorsa DM, Johnston CA. 1995b. Oxytocin receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during the estrous cycle. *J Neuroscience*, 15:5058-5064.

Bale TL, Davis AL, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM. 2001. CNS Region-specific oxytocin receptor expression: Importance in regulation of anxiety and behaviour. *J Neuroscience*, 21(7):2546-2552.

Barberis C, Tribollet E. 1996. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol*, 10:119-154.

Beckmann H, Lang RE, Gattaz WF. 1985. Vasopressin-oxytocin in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients and normal controls. *Psychoneuroendocrinology*, 10:187-191.

Benelli A, Poggioli R, Luppi P, Ruini L, Bertolini A, Arletti R. 1994. Oxytocin enhances, and oxytocin antagonism decreases, sexual receptivity in intact female rats. *Neuropeptides*, 27:245-250.

Bernstein HG, Stanarius A, Baumann B, Henning H, Krell D, Danos P, Bogerts B. 1998. Nitric oxide Synthase-neurons in the human hypothalamus, reduced number of cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics. *Neuroscience*, 83(3):867-75.

Berube D, Seralinu GE, Gagne R, Hammond GL. 1990. Localization of the sex hormone binding globulin (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogen Cell Genet*, 54(1-2):65-7.

Bleuler E. 1983. Lehrbuch der Psychiatrie. 15. Auflage. Heidelberg, New York: Springer Verlag.

Boccia ML, Panicker AK, Pedersen C, Petrusz P. 2001. Oxytocin receptors in non-human primate brain visualized with monoclonal antibody. *Neuroreport*, 12(8):1723-6.

Bordin S, Petra PH. 1980. Immunocytochemical localization of the sex steroid-binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*. *PNAS*, 77:5678-5682.

Breton C, Zingg HH. 1997. Expression and region specific regulation of the Oxytocin receptor gene in the rat brain. *Endocrinology*, 138(5):1857-62.

Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH. 1995. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 136:2928-2936.

Broad KD, Levy F, Evans G, Kimura T, Keverne EB, Kendrick KM. 1999. Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci*, 11:3725-3737.

Bruins J, Hijman R, Van Ree JM. 1992. Effect of a single dose of des-glycinamide-[Arg⁸]vasopressin or oxytocin on cognitive processes in young healthy subjects. *Peptides*, 13:461-468.

Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, van Leeuwen FW. 1978. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res*, 186(3):423-33.

Buijs RM, Devries GJ, Van Leeuwen FW. 1985. Distribution and synaptic release of oxytocin in the central nervous system. *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*. Amsterdam: Excerpta Med, 77-86.

Burbach JP, Lopes Da Silva S, Cox JJ, Adan RA, Cooney AJ, Tsai MJ, Tsai SY. 1994. Repression of estrogen dependent stimulation of the oxytocin gene by chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor. *J Biol Chem*, 246:15046-15053.

Caldwell JD. 2001. Evidence of sex Hormone binding globulin binding sites in the medial preoptic area and Hypothalamus. *Horm Metab Res*, 33(1):7-9.

Caldwell JD, Prange AJ, Pedersen CA. 1986. Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides*, 7:175-189.

Caldwell JD, Hofle S, Englof I. 2002. Sex hormone binding Globulin facilitates female sexual receptivity except when coupled to dihydrotestosterone. *Brain Research*, 6,948(1-2):102-7.

Carter CS. 1992. Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 16:131-144.

Caldwell JD, Johns JM, Fagg BM, Senger MA, Pedersen CA. 1994. Infusion of oxytocin antagonist into the medial preoptic area prior to progesterone inhibits sexual receptivity and increases rejection in female rats. *Horm Behav*, 28(3):288-302.

Carmichael MS, Humbert R, Diken J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. 1987. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab*, 64:27-31.

Carter CS. 1992. Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 16:131-144.

Carter CS. 1998. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*, 23:779-818.

Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. 1993. Influence of oxytocin on renal haemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci*, 689-362.

Dale HH. 1906. On some physiological actions of ergot. *J Physiol*, 34:163-206.

Daly RC, Su TP, Schmidt PJ, Pagliaro M, Pickar D, Rubinov DR. 2003. Neuroendocrine and behavioural effects of high dose anabolic steroid administration in male normal volunteers. *Psychoneuroendocrinology*, 28(3):317-31.

Demitrack MA, Lessem MD, Listwak SJ, Brandt HA, Jimerson DC, Gold PW. 1990. CSF oxytocin in anorexia nervosa and bulimia nervosa: clinical and pathophysiologic considerations. *Am J Psychiatry*, 147:882-886.

Ding VD, Moller DE, Feeney WP, Didolkar V, Nakhla AM, Rhodes L, Rosner W, Smith RG. 1998. Sex hormone-binding globulin mediates prostate androgen receptor action via a novel signaling pathway. *Endocrinology*, 139(1):213-8.

Di-Scala GD, Strosser MT. 1995. Downregulation of the oxytocin receptor on cultured astroglial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 268:C413-C418.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett CP. 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem*, 205:949-957.

- Favaretto AL, Ballejo GO, Albuquerque AW, Gutowska J, Antunes RJ, McCann SM. 1997. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*, 18:1377-1381.
- Feifel D, Reza T. 1999. Oxytocin modulates psychotomimetic-induced deficits in sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl.)*, 141(1):93-8.
- Fernlund P, Gershagen S. 1990. 2-Iodoestradiol binds with high Affinity to human sex hormone binding globulin (SHBG). *J Biochem*, 36(1-2):75-81.
- Fortunati N, Raineri M, Cignetti A, Hammond GL, Frairia R. 1998. Control of the membrane sex hormone-binding globulin-receptor (SHBG-R) in MCF-7 Cells: effect of locally produced SHBG. *Steroids*, 63(5-6):282-4.
- Fortunati N, Becchis M, Catalano MG, Comba A. 1999. Sex hormone binding globulin, its membrane receptor and breast cancer a new approach to the modulation of estradiol action in neoplastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69(1-6):473-9.
- Frayne J, Nicholson HD. 1998. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod*, 4(6):527-537.
- Fuchs AR, Fields MJ, Friedman S, Shemesh M, Ivell R. 1995. Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F2alpha and F2 release. *Adv Exp Med Biol*, 395:405-420.
- Gainer H. 1998. Cell specific gene expression in oxytocin and vasopressin magnocellular neurons. *Adv Exp Med Biol*, 449:15-27.
- Gainer H, Yamashita M, Fields RL, House SB, Rusnak M. 2002. The magnocellular neuronal phenotype: cell-specific gene expression in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Brain Research*, 139:1-14.

- Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski G, Caldwell JD. 2003. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology*, 78(2):61-71.
- Germain P, Egloff M, Kiefer H, Metezeau P, Habrioux G. 1997. Use of confocal microscopy to localize the SHBG interaction with human breast cancer cell lines-a comparison with serum albumin interaction. *Cellular and Molecular Biol*, 43:501-508.
- Gershagen S, Doeberl A, Jeppsson S, Rannevik G. 1989. The amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. *J Biol Chem*, 264(32):19066-75.
- Glosh R, Sladek CD. 1995. Role of the prolactin and gonadal steroids in regulation of oxytocin mRNA during lactation. *Am J Physiol*, 269:E76-79.
- Glovinsky D, Kalogeras KT, Kirch DG, Suddath R, and Wyatt RJ. 1994. Cerebrospinal fluid oxytocin concentration in schizophrenic patients does not differ from control subjects and is not changed by neuroleptic medication. *Schizophr Res*, 11:273-276.
- Gorzalka BB, Lester GL. 1987. Oxytocin-induced facilitation of lordosis behaviour in rats is progesterone-dependent. *Neuropeptides*, 10:55-65.
- Griffin PR, Kumar S, Shabanowitz J, Charbonneau H, Namkung PC, Walsh KA, Hunt DF, Petra PH. 1989. The amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. *J Biol Chem*, 264(32):19066-75.
- Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammkond GL, Muller YA. 2000. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin g-like domain. *EMBO J*, 19(4):504-12.
- Gunsalus GL, Larrea F, Musto NA, Becker RR, Mather JP, Bardin CW. 1981. Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function. *J Steroid Biochem*, 15:99-106.

Hansson V, Weddington SC, Petrusz P, Ritzen EM, Nayfeh SN, French FS. 1975. FSH stimulation of testicular androgen binding protein (ABP): comparison of ABP response and ovarian augmentation. *Endocrinology*, 97:469-73.

Harris MC, Jones PM, and Robinson IC. 1981. Differences in the release of oxytocin into the blood and cerebrospinal fluid following hypothalamic and pituitary stimulation in rats. *J Physiol (Lond)*, 320:109-110.

Harya Y, Battey J, Gainer H. 1990. Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Mol Brain Res*, 8:319-324.

Henry JP, Wang S. 1998. Effects of early stress on adult affiliative behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 23:863-875.

Herbert Z, Sauer B, Jirikowski GF. 2001. Sexual dimorphism in rat oxytocinergic hypothalamic regions. *Eur J Anat*, 5(3):139-143.

Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englöf I, Caldwell JD. Distribution of androgen binding protein in the rat hypothalamo-hypophyseal system, co-localisation with oxytocin. *Brain Res*, 992(2):151-8.

Ho MY, Carter DA, Ang HL, Murphy D. 1995. Bovine oxytocin transgenes in mice. Hypothalamic expression, physiological regulation, and interactions with the vasopressin gene. *J Biol Chem*, 270:27199-27205.

Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM, ST George J, Levy NC, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine factor. *J Biol Chem*, 277:26618-26622.

Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikukuchi T, Kubota Y, Ogita K, Saji F. 1994. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem*, 269:32451-32456.

Insel TR. 1992. Oxytocin, a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology*, 17:3-35.

- Ip YC, Lee WM, Hammond GL. 2000. The rabbit sex hormone-binding globulin gene: structural organization and characterisation of its 5-flanking region. *Endocrinology*, 141(4):1356-65.
- Ivell R, Ritcher D. 1984. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:2006-2010.
- Ivell R, Walther N. 1999. The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Mol Cell Endocrinol*, 151:95-101.
- Janne M, Hogeveen KN, Doel HK, Hammond GL. 1999. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology*, 140(9):4166-74.
- Jezova D, Skultetyova I, Tokarev DI, Bakos P, Vigas M. 1995. Vasopressin and oxytocin in stress. *Ann NY Acad Sci*, 771:192-203.
- Jirikowski GF, Ramalho-Ortigao JF, Kesse KW, Bloom FE. 1990. In situ hybridization of semithin Epon sections with BrdU labelled oligonucleotide probes. *Histochemistry*, 94(2):187-90.
- Joseph DR, Hall SR, French FS. 1987. Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:339-43.
- Joseph DR, Power SG, Petrusz P. 1997. Expression and distribution of androgen-binding protein/sex hormone binding globulin in the female rodent reproductive system. *Biol Reprod*, 56(1):14-20.
- Kandel E. 1991. Principles of Neural Science. Dritte Auflage. New York: Elsevier-Verlag, 853-868.
- Kennell JH, Jerauld R, Wolfe H, Chesler D, Kreger NC, McAlpine W, Steffa M, Klaus MH. 1974. Maternal behavior one year after early and extended post-partum contact. *Dev Med Child Neurol*, 16:172-179.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. 1992. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*, 356:526-529.

Kimura T, Makino Y, Saji F, Takemura M, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Azuma C, Nobunaga T, Tokugawa Y, Tanizawa O. 1994. Molecular characterization of cloned human oxytocin receptor. *Endocrinology*, 131:385-390.

Kupfermann I. 1991. *Principles of Neural Science*. Dritte Auflage. New York: Elsevier-Verlag, 733-749.

Ky B, Shughrue PJ. 2002. Methods to enhance signal using isotopic in situ hybridization. *J Histochemical Cytochem*, 50(8):1031-7.

Larrea F, Diaz L, Carino C, Larriva-Sahd J, Carrillo L, Orozco H, Ulloa-Aguirre A. 1993. Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression, *J of Steroid Biochem and Mol Biol*, 46:497-505.

Lefebvre DL, Lariviere R, Zingg HH. 1993. Rat amnion: a novel site of oxytocin production. *Biol Reprod*, 48:632-639.

Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg HH. 1992. Oxytocin gene expression in the rat uterus. *Science*, 256:1553-1555.

Legros JJ, Gazzotti C, Carvelli T, Franchimont P, Timsit BM, Von Frenckell R, Ansseau M. 1992. Apomorphine stimulation of vasopressin- and oxytocin-neurophysins. Evidence for increased oxytocinergic and decreased vasopressinergic function in schizophrenics. *Psychoneuroendocrinology*, 17:611-617.

Lewis JG, Longley NJ, Elder PA. 1999. Monoclonal antibodies to human sex hormone-binding globulin (SHBG) characterization and use in a simple enzyme linked immunosorbent assay. *Steroids*, 62(4):259-65.

Loup F, Tribollet E, Dubois DM, Dreifuss JJ. 1991. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res*, 555:220-232.

Mai JK, Berger K, Sofroniew MV. 1993. Morphometric evaluation of neurophysin immunoreactivity in the human brain: Pronounced inter-individual variability and evidence for altered staining patterns in schizophrenia. *J Hirnforsch*, 34(2):133-54.

Martin A, State M, Anderson GM, Kaye WM, Hanchett JM, McConaha CW, North WG, Fleckman

- J. 1998. Cerebrospinal fluid levels of oxytocin in Prader-Willi syndrome: a preliminary report. *Biol Psychiatry*, 44:1349-1352.
- Mazurek MF, Beal MF, Bird ED, Martin JB. 1987. Oxytocin in Alzheimer's disease: postmortem brain levels. *Neurology*, 37:1001-1003.
- McCarthy MM, Altemus DM. 1997. Central nervous system actions of oxytocin and modulation of behavior in humans. *Mol Med Today*, 3:269-275.
- McCarthy MM, McDonald CH, Brooks PJ, Goldman D. 1996. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav*, 60:1209-1215.
- Melis MR, Argiolas A. 1997. Role of central nitric oxide in the control of penile erection and yawning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21:899-922.
- Melis MR, Argiolas A, Gessa GL. 1986. Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. *Brain Res*, 398:259-265.
- Meyer S, Brumm C, Stegner HE, Sinnecker GH. 1994. Intracellular sex hormone-binding globulin (SHBG) in normal and neoplastic breast tissue-an additional marker for hormone dependency? *Exp Clin Endocrinol*, 102(4):334-340.
- Michellini S, Urbanek M, Dean M, Goldman D. 1995. Polymorphism and genetic mapping of the human oxytocin receptor gene on chromosome 3. *Am J Med Genet*, 60:183-187.
- Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Tamaya T. 1997. Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant messenger RNA in human uterine endometrial cancers. *Cancer Res*, 57(24):5579-5583.
- Misao R, Itoh N, Mori H, Fujimoto J, Tamaya T. 1994. Sex hormone-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium. *Eur J of Endocrinol*, 131(6):623-629.
- Mittaud P, Labourdette G, Zingg H, Guenot- Di Scala D. 2002. Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes: involvement of TGF- β and membrane components. *Glia*, 37(2):169-77.

Möller HJ, Laux G, Deister A. 2001. *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2. Auflage. Stuttgart:Thieme-Verlag, Duale Reihe, 134-161.

Monteleone P, Piccolo A, Martino M, Maj M. 1994. Seasonal variation in the dexamethasone suppression test: a longitudinal study in chronic schizophrenics and in healthy subjects. *Neuropsychobiology*, 30(2-3):61-5.

Mohr E, Bahnsen U, Kiessling C, Richter D. 1988. Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occur in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett*, 242:144-148.

Moos F, Richard P. 1989. Paraventricular and supraoptic bursting oxytocin cells in rat are locally regulated by oxytocin and functionally related. *J Physiol (Lond)*, 408:1-18.

Moore KH, Bertram KA, Gomez RR, Styner MJ, Matey LA. 1996. Sex hormone-binding globulin mRNA in human breast cancer detection cell lines and tumor samples. *J of Steroid Biochem and Mol Biol*, 59:297-304.

Moos F, Poulain DA, Rodriguez F, Guerne Y, Vincent JD, Richard P. 1989. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. *Exp Brain Res*, 76:593-602.

Murell TG. 1995. The potential for Oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis. *Breast cancer Res Treat*, 35:225-229.

Murphy MR, Checkley SA, Seckl JR, Lightman SL. 1990. Naloxone inhibits oxytocin release at orgasm in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 71:1056-1058.

Muruyama Y, Hammond GL, Gugihara K. 1999. The shbg gene and hormone dependent breast cancer: a novel mechanism of hormone dependence of breast cancer cells based upon SHBG. *Breast cancer*, 6:338-343.

Nelson EE, Panksepp J. 1998. Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin and norepinephrine. *Neurosci Biobehav Rev*, 22:437-452.

Neo G. 1999. Sex hormone binding globulin expression and colocalization with estrogen receptor in the human fallopian tube. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68(3-4):111-7.

Newcomer JW, Craft S, Askins K, Hershey T, Bardgett ME, Csernansky JG, Gagliardi AE, Vogler G. 1998. Glucocorticoid interactions with memory function in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 23(1):65-72.

Ott J, Scott JC. 1910. The galactologue action of the the thymus and and corpus luteum. *Proc Sol Exp Biol*, 8:49.

Page SR, Ang VT, Jackson R, White A, Nussey SS, Jenkins JS. 1990. The effect of oxytocin infusion on adenohipophysial function in man. *Clin Endocrinol Oxf*, 32:307-313.

Patisaul HB, Scordalakes EM, Young LJ, Rissman EF. 2003. Oxytocin, but not oxytocin receptor are regulated by estrogen receptor beta in the female mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 15(8):787-93.

Pedersen CA, Prange AJ. 1979. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:6661-6665.

Pedersen CA, Boccia ML. 2002. Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behaviour: effects of a highly selective oxytocin antagonist. *Horm Behav*, 41(2):170-7.

Pedersen CA, Caldwell JD, Peterson G, Walker CH, Mason GA. 1992. Oxytocin activation of maternal behavior in the rat. *Ann NY Acad Sci*, 652:58-69.

Peterssen M, Lundeberg T, Uvnas MK. 1999. Short term increase and long term decrease of blood pressure in response to oxytocin-potentiating effects of female steroid hormones. *J Cardiovasc Pharmacol*, 33:103-108.

Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF. 1996. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 53:137-143.

RaoVV, Loffler C, Battey J, Hansmann I. 1992. The human gene for oxytocin neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 61:271-273.

Renaud LP, Bourque CW. 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol*, 36:131-169.

Reventos J, Sullivan PM, Joseph DR, Gordon JW. 1993. Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/ sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice. *Mol Cell Endocrinology*, 96(1-2):69-73.

Richard P, Moos F, Freund MM. 1991. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev*, 71:331-370.

Rose JP, Wu CK, Hsiao CD, Breslow E, Wang BC. 1996. Crystal structure of the neurophysin oxytocin complex. *Nat Struct Biol*, 3:193-169.

Rozen F, Russo C, Banville D, and Zingg HH. 1995. Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:200-204.

Sausville E, Carney D, Battey J. 1985. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cell cancer cell line. *J Biol Chem*, 260(18):10236-10241.

Scantamburlo G, Ansseau M, Legros JJ. 2001. Role of the Neurohypophysis in the psychological stress. *Encephale*, 27(3):245-59.

Schäfer H. 2003. Veränderungen der Oxytocin Rezeptor Expression im Bulbus olfactorius schizophrener Patienten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Silva WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L. 1991. Hormonal secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod*, 45:655-663.

Simmons CFJr., Clancy TE, Quan R, Knoll JH. 1995. The oxytocin receptor gene (OXTR) localizes to human chromosome 3p25 by fluorescence in situ hybridization and PCR analysis of somatic cell hybrids. *Genomics*, 26(3):623-625.

Sinnecker G, Hiort O, Mitze M, Donn F, Neumann S. 1988. Immunohistochemical detection of sex hormone-binding globulin like antigen in tissue sections of normal human prostate, benign prostate hypertrophy and normal human endometrium. *Steroids*, 52:335-336.

Sofroniew MV. 1985. Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy: GABA and Neuropeptides in the CNS*. Amsterdam: Elsevier, 93-165.

Strosser MT, Evrard ME, Breton C, Guenot Di-Scala D. 2001. Phorbol ester differentially regulates oxytocin receptor binding activity in hypothalamic cultured neurons and astrocytes. *Peptides*, 22(4):677-83.

Sui LM, Lennon J, Ma C, McCann I, Woo I, Petra PH. 1999. Heterologous expression of wild type and deglycosylated human sex steroid-binding globulin (SHBG) in the yeast, *Pichia pastoris*. Characterization of recombinant proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68(3-4):119-27.

Takemura M, Kimura T, Nomura S, Makino Y, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Tokugaya Y, Nobunaga T, Kamiura S, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitanura Y, Tanizawa O. Expression and localization of human oxytocin receptor mRNA and its protein in chorion and decidua during parturition. *J Clin Invest*, 93:2319-2322.

Tardivel-Lacombe J, Egloff M, Mazabraud A, Degrelle H. 1984. Immunohistochemical detection of sex steroid-binding plasma protein in human mammary carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 118:448-494.

Trepel M. 1999. *Neuranatomie: Struktur und Funktion*. 2. Auflage. München, Jena: Urban und Fischer, 169-172.

Tribollet E, Dubois DM, Dreifuss JJ, Barberis C, Jard S. 1992. Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann NY Acad Sci*, 652:29-38.

Tribollet E, Audigier S, Dubois DM, and Dreifuss JJ. 1990. Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Res*, 511:129-140.

Uvnas-Moberg K. 1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology*, 23:819-835.

Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. 1998. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in the brain. *Endocrinology*, 139(12):5015-33.

Vasevudan N, Davidkova G, Zhu YS, Koibuchi N, Chin WW, Pfaff D. 2001. Differential interaction of estrogen receptor and thyroid hormone receptor isoforms on the rat oxytocin receptor promoter leads to differences in transcriptional regulation. *Neuroendocrinology*, 74(5):309-24.

Wang YM, Bayliss DA, Millhorn DE, Petrusz P, Joseph DR. 1990. The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain. *Endocrinology*, 127(6):3124-30.

Williams JR, Insel TR, Harbaugh CR, Carter CS. 1994. Oxytocin administered centrally facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J Neuroendocrinol*, 6:247-250.

Witt DM, Insel TR. 1991. A selective oxytocin antagonist attenuates progesterone facilitation of female sexual behavior. *Endocrinology*, 128:3269-3276.

Young LJ, Wang Z, Insel TR. 1998. Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends Neurosci*, 21:71-75.

Yoshimura R, Kimura T, Watanabe D, Kiyama H. 1996. Differential expression of oxytocin receptor mRNA in the developing rat brain. *Neurosci Res*, 24:291-304.

Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, and Tohyama M. 1993. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology*, 133:1239-1246.

Lebenslauf

Sabrina Anderson de la Llana
geb. am 12.01.1980 in St.Martin d'Hères, Frankreich
Nationalitäten: spanische, französische, englische



Schulbildung:

- 1985-86: Watkins Mill Elementary School Maryland, USA
- 1986-90: Kalktarren und Hofacker Zürich, CH
- 1990-91: Deutsche Schule Zaragoza, E
- 1991-98: Collège et Lycée International Stendhal Grenoble, F
- Mai 1998: Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz – Stufe II

Hochschulzugangsberechtigung:

- Juni 1998: Baccalauréat Scientifique (Spécialité Biologie)

Studium:

- Seit 1998: Medizinstudium an der Friedrich Schiller Universität Jena, D
- Herbst 2000: Ärztliche Vorprüfung
- Herbst 2001: 1. Staatsexamen
- März 2004: 2. Staatsexamen
- Mai 2005: 3. Staatsexamen

Praktika und Kurse:

- 1999: 2 Monate Anästhesiologie Grenoble, F
- März 2001: Famulatur in einer Neuropädiatriepraxis Zürich, CH
- Oktober 2001: Famulatur in der Inneren Medizin im Universitätsklinikum der Complutense Madrid, E
- September 2002: Famulatur Innere Medizin, Schwerpunkt tropische Krankheiten, und Pädiatrie Tamale, GHANA
- März 2003: Famulatur Neurologie, Hospital General Universitario Alicante, E
- April 2003: Tropenkurs (an der FSU) Jena, D
- Oktober 2003: Famulatur Intensivmedizin, Hospital Miguel Enriquez Havanna, CUBA

Praktisches Jahr (April 2004-März 2005)

- 1.Tertial: Chirurgie, Gondar School of Medical Sciences Gondar, Äthiopien

- 2.Tertial: 1.Teil: Pädiatrie: Hospital Universitario Salamanca, E
2.Teil: Pädiatrie: Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, E
Universidad de Barcelona
- 3.Tertial: Innere Medizin: Hospital Gemans Trias i Pujol Barcelona, E
Universidad Autonoma de Barcelona

Forschungssemester:

- März-Juli 2002: UNC, Psychiatrics Departement unter Leitung von Prof. Cort Pedersen. Chapel Hill, USA

Publikationen:

- 2003: Anderson S, Jirikowski GF, Schäfer HH, Bernstein HG, Ebersberger D, Caldwell JD, LOKALISATION OF SEX HORMONE BINDING GLOBULIN (SHBG) IN MAGNOCELLULAR NEURONS OF THE HUMAN HYPOTHALAMUS: Neuroscience Congress, New Orleans Abstract Nr.1655.

Berufliche Tätigkeit

- 2001-2005: Tutorin im Histologiekurs der medizinischen Fakultät der FSU Jena.

Jena, den 10. 05. 2005

Sabrina Anderson de la Llana

Danksagung:

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. G. Jirikowski bedanken für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, seine Ratschläge, Ideen und vor allem für seine Geduld und Hilfe bei der Fertigstellung dieses Manuskriptes.

Großer Dank geht an Dr. Zofia Herbert, die mir die Methodik der Immunhistochemie beibrachte und sehr oft Ratschläge für die Auswertung und Bildbearbeitung gab.

Bei Prof. C. Pedersen und Dr. M. Boccia bedanke ich mich besonders für Ihre Betreuung an der Universität von North Carolina, Chapel Hill, sowie bei dem Team des Labors: Prof. P. Petrusz, Frau G. Grossmann und Dr. M. da Silva für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Forschung in den USA. Dem Boehringer Ingelheim Fonds verdanke ich die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsaufenthalts.

Ganz besonders möchte ich mich bei unserer MTA Frau E. Schönfeld bedanken, die immer bereit war, mir in der Durchführung der Färbungen und Western Blots zu helfen.

Mein Dank gebührt ebenfalls Frau A. Brandstädt für ihre statistischen Ratschläge.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. A. Tellería-Díaz, der mir viele wichtige Ratschläge und Unterstützung für diese Arbeit gab.

Bei Hendrik Schäfer, Heidi Beinhauer bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor und für die zahlreichen interessanten Tipps.

An Oliver Prange und Jens Aßmann geht großer Dank für die Unterstützung bei der Fertigstellung des Manuskripts.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern Marian Anderson und Dr. Ian Anderson, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, besonders bei meiner Schwester Rebecca Anderson de la Llana und meiner Mutter Marian Anderson de la Llana bedanken, die immer an meiner Seite standen und mich liebevoll unterstützten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. G. Jirikowski und Dr. Z. Herbert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 20. 05. 2005

Sabrina Anderson de la Llana